

GEORGIA VANZ

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE BLENDA
DE QUITOSANA/POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) INCORPORADOS
COM CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO

FLORIANÓPOLIS-SC
2010

GEORGIA VANZ

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE BLENDA
DE QUITOSANA/POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) INCORPORADOS
COM CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira.

Co-Orientador: Prof. Dr. Valfredo Tadeu de Fávère.

Florianópolis-SC
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

V285p Vanz, Georgia

Preparação e caracterização de filmes de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) incorporados com clorofilina cúprica de sódio [dissertação] / Georgia Vanz ; orientador, Mauro Cesar Marghetti Laranjeira. - Florianópolis, SC, 2010.

62 p.: grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Quitosana. 3. Blendas poliméricas. 4. Clorofilina Cúprica de sódio I. Laranjeira, Mauro César Marghetti. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Georgia Vanz

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE BLENDA
DE QUITOSANA/POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) INCORPORADOS
COM CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de
Mestre em Química no **Programa de Pós-Graduação em Química** da
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 04 de março de 2010.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mauro C. M. Laranjeira
Orientador

Profa. Dra. Vera L. A. Frescura

Prof. Dr. Valfredo Tadeu de Fávère
Co-orientador

Profa. Dra. Tereza C. R. de Souza

Prof. Dr. Bruno Szpoganicz

Dedico este trabalho aos meus pais Vitor e Mildre, pelo apoio, carinho e amor, dedicados em todos os anos de minha vida.

Ao meu amor Gustavo, pelo companheirismo, apoio e carinho no desenvolvimento deste trabalho e em todos os dias de nossa história juntos.

Ao meu filho João Vitor, pela sua chegada durante esta etapa da minha vida, enchendo os nossos dias de alegrias.

Agradecimentos

À Deus

À minha família, por todo carinho e apoio em todos os momentos de minha vida, em especial aos meus pais Vitor e Mildre.

Ao meu amor e companheiro Gustavo pelo carinho, apoio, incentivo e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mauro César Marghetti Laranjeira, pelo apoio, amizade, incentivo e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Artur Smania, do Departamento de Biologia da UFSC, pelo auxílio nos testes de atividade antibacteriana.

À Profa. Dra. Tereza Cristina Rozone de Souza, pelo fornecimento do corante Clorofilina Cúprica de Sódio.

Aos professores da banca pela participação e pela colaboração em sugestões para o trabalho.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina e a Central de Análises pelo apoio. À Marly Soldi pela amizade, apoio e sugestões nas análises térmicas.

Aos professores e amigos do QUITTECH, pela amizade e apoio no desenvolvimento deste trabalho. Em especial ao Rogério, Alexandre, Elaine, Loreana, Carol e Denice pelas sugestões e auxílio neste estudo.

À CAPES pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

Índice de Figuras.....	11
Índice de Tabelas.....	13
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Corantes Naturais.....	20
2.2 O Pigmento Natural Clorofila.....	21
2.3 Blendas Poliméricas.....	23
2.4 Biopolímero Quitosana.....	24
2.5 Poli(álcool vinílico) (PVA).....	25
2.6 Aditivo Inorgânico: Nanopartículas de ZnO.....	26
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral.....	29
3.2 Objetivos Específicos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Materiais.....	30
4.2 Métodos.....	30
4.2.1 Preparação de nanopartículas de ZnO.....	30
4.2.2 Preparação de filmes de blendas de QTS/PVA e QTS/PVA incorporados com CCS.....	30
4.2.3 Preparação de filmes de blendas de QTS/PVA incorporados com CCS e nanopartículas de ZnO.....	32
4.2.4 Técnicas Empregadas na Caracterização das Nanopartículas de ZnO.....	33
Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de	
4.2.4.1 Campo (FEG).....	33
Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X	
4.2.4.2 (EDX).....	33
4.2.5 Técnicas Empregadas na Caracterização dos Filmes de Blendas.....	33
4.2.5.1 Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	33
4.2.5.2 Análise Termogravimétrica (TG).....	33
4.2.5.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	33

4.2.5.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-EDX).....	34
4.2.5.5	Determinação do Grau de Intumescimento (GI).....	34
4.2.5.6	Determinação da Espessura Média dos Filmes.....	35
4.2.5.7	Determinação das Propriedades Mecânicas dos Filmes.....	35
4.2.5.8	Teste de Atividade Antibacteriana.....	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1	Caracterização das Nanopartículas de ZnO.....	36
5.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (FEG).....	36
5.1.2	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X (EDX).....	37
5.2	Caracterização dos Filmes de Blendas.....	37
5.2.1	Espectroscopia no Infravermelho (IV).....	37
5.2.2	Análise Termogravimétrica (TG).....	40
5.2.3	Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	45
5.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	48
5.2.5	Intumescimento dos Filmes.....	51
5.2.6	Determinação das Propriedades Mecânicas para os Filmes de Blendas.....	52
5.2.7	Avaliação da Atividade Antibacteriana dos Filmes de Blendas.....	55
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
7.	PERSPECTIVAS DO TRABALHO.....	58
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

Índice de Figuras

Figura 1.	Estrutura química da clorofila a e clorofila b.....	22
Figura 2.	Estrutura química da clorofilina cúprica de sódio.....	23
Figura 3.	Estrutura química da quitosana.....	25
Figura 4.	Estrutura química do PVA.....	26
Figura 5.	Micrografia das nanopartículas de ZnO obtidas via FEG.....	36
Figura 6.	Análise de EDX para as nanopartículas de ZnO.....	37
Figura 7.	Espectros de Infravermelho dos filmes de blendas QTS/PVA em diferentes proporções.....	38
Figura 8.	Espectros de infravermelho para os filmes de blendas de QTS/PVA, QTS/PVA incorporados com CCS em diferentes proporções de polímero: (A) 3:1, (B) 3:2 e (C) 1:1 e espectro de infravermelho da CCS.....	39
Figura 9.	Espectros de infravermelho para os filmes de blendas de QTS/PVA 1:1 incorporados com CCS(2), ZnO(1) e ZnO(2).....	40
Figura 10.	Análise termogravimétrica dos filmes de QTS, PVA e filmes de blendas de QTS/PVA em diferentes proporções.....	41
Figura 11.	Análise termogravimétrica dos filmes de blendas de QTS/PVA e QTS/PVA incorporados com CCS em diferentes proporções de polímero: (A) 3:1, (B) 3:2 e (C) 1:1.....	44
Figura 12.	Análise termogravimétrica dos filmes de blendas de QTS/PVA 1:1 incorporados com CCS (2), ZnO(1) e ZnO(2).....	45
Figura 13.	Perfil da análise de DSC para os filmes de blendas de QTS/PVA em diferentes proporções.....	46
Figura 14.	Perfil da análise de DSC para os filmes de blendas de QTS/PVA e QTS/PVA incorporados com CCS em diferentes proporções de polímero: (A) 3:1, (B) 3:2 e (C) 1:1.....	47
Figura 15.	Perfil da análise de DSC para os filmes de blendas de QTS/PVA 1:1 incorporados com CCS(2), ZnO(1) e ZnO(2).....	48
Figura 16.	Micrografias da fratura transversal dos filmes de blendas QTS/PVA: A) 3:1, B) 3:2 e C)1:1.....	49
Figura 17.	Micrografias da fratura transversal dos filmes de	

	blendas de QTS/PVA incorporados com CCS: A) QTS/PVA 3:1 - CCS(1), B) QTS/PVA 3:1 - CCS(2), C) QTS/PVA 3:2 - CCS(1), D) QTS/PVA 3:2 - CCS(2), E) QTS/PVA 1:1 - CCS(1) e F) QTS/PVA 1:1 - CCS(2).....	50
Figura 18.	Micrografias da fratura transversal dos filmes de blendas de QTS/PVA incorporados com CCS e nanopartículas de ZnO, obtidas via MEV-EDX: A) QTS/PVA 1:1 - CCS(2) – ZnO(1) e B) QTS/PVA 1:1 - CCS(2) – ZnO(2).....	51

Índice de Tabelas

Tabela 1.	Denominações e composições dos filmes de blendas....	32
Tabela 2.	Parâmetros termogravimétricos obtidos para os diferentes filmes de blendas.....	42
Tabela 3.	Intumescimento para os diferentes filmes de blendas obtidos neste estudo.....	52
Tabela 4.	Propriedades mecânicas dos diferentes filmes de blendas.....	53
Tabela 5.	Atividade antibacteriana de diferentes filmes de blendas de QTS/PVA contra duas estirpes bacterianas.....	55
Tabela 6.	Porcentagem de redução de microrganismos para os filmes de blendas.....	55

Lista de Siglas e Abreviaturas

CCS	Clorofilina Cúprica de Sódio
DrTG	Análise Termogravimétrica Diferencial
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
IV	Análise de Espectroscopia no Infravermelho
PVA	Poli(álcool vinílico)
QTS	Quitosana
TG	Análise Termogravimétrica
ZnO	Óxido de Zinco
GI	Grau de Intumescimento
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
pKa	Constante de Acidez
Tg	Temperatura de Transição Vítrea
m/m	Proporção massa/massa
EDX	Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X
FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo
UFC	Unidade Formadora de Colônias

Resumo

Neste estudo foram sintetizadas nanopartículas de ZnO pelo método dos Precursores Poliméricos e as mesmas foram caracterizadas pelas análises de FEG e EDX. A análise de FEG mostra partículas esféricas homogêneas, com tamanhos de distribuição uniforme compreendendo uma faixa de 55nm a 100nm aproximadamente. A análise dispersiva de raio X (EDX) mostra a presença dos elementos Zn e O (94,93% e 5,07%, respectivamente) nas partículas formadas. Ainda, no presente estudo, foram desenvolvidos filmes de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) (3:1; 3:2 e 1:1) incorporados com 2,5% e 5% de clorofilina cúprica de sódio (CCS) e filmes de blendas quitosana/poli(álcool vinílico) 1:1 incorporados com 5% de CCS e ZnO (5% e 7,5%) utilizando a técnica de casting. As amostras de filmes resultantes foram caracterizadas por IV, TG, DSC e MEV. Além disso, foram avaliadas as suas propriedades mecânicas e algumas amostras foram submetidas a teste de atividade antibacteriana. A análise de TG mostra uma maior estabilidade térmica para os filmes com maior fração de PVA na blenda polimérica incorporada com 5% de CCS e menor estabilidade térmica para os filmes com maior quantidade de ZnO na matriz polimérica. As micrografias para os filmes formados revelam certa rugosidade, sendo esta aumentada com o aumento de CCS na matriz. Algumas micrografias mostram ainda, a presença de pequenas rachaduras na estrutura interna dos filmes. Os ensaios mecânicos indicam um aumento na maleabilidade dos filmes com o aumento do teor de PVA e diminuição da quantidade de CCS incorporada. Os filmes contendo ZnO na sua composição foram os que apresentaram maior rigidez. O teste de atividade antibacteriana mostra uma maior eficiência dos filmes contendo 5% de CCS e 7,5% de ZnO na redução de microrganismos viáveis, sendo que de um modo geral os filmes testados provocaram uma maior diminuição de bactérias gram-negativas (*Escherichia Coli*).

Abstract

In this study, we synthesized ZnO nanoparticles using the Polymeric Precursor method and they were characterized through FEG and EDX analysis. FEG analysis shows homogeneous spherical particles which display uniform size of distribution ranging from 55 nm to 100 nm approximately. Energy Dispersive X-ray Analysis (EDX) shows the presence of Zn and O (94.93 % and 5.07 % respectively) in the particles. Moreover, we developed chitosan/poly(vinyl alcohol) blend films (3:1; 3:2 and 1:1) incorporated with 2.5 % and 5 % of sodium copper chlorophyllin (SCC) and chitosan/poly(vinyl alcohol) blend films (1:1) incorporated with 5% of SCC and ZnO (5% and 7.5%) using casting technique. The film samples were characterized through FTIR, TG, DSC and SEM. Furthermore, their mechanical properties were evaluated and some samples were submitted to antibacterial activity tests. TG analysis shows a higher thermal stability for films with bigger PVA fraction in the polymeric blend incorporated with 5% of SCC and lower thermal stability for the films with higher amount of ZnO in the polymeric matrix. The micrographs of the films show some roughness, which grows with the increase of SCC in the matrix. Some micrographs also show the presence of small laceration in the internal structure of the films. The mechanical experiments indicate an increase in the malleability of the films with the growth of PVA content and the decrease of the amount of incorporated SCC. The films which contain ZnO presented more rigidity. The test for antibacterial activity shows more efficiency of the films containing 5% of SCC and 7.5 % of ZnO in the reduction of viable microorganisms and the tested films generally provoked more decrease of the gram-negative bacteria (*Escherichia Coli*).

1. Introdução

Os corantes naturais, derivados de plantas, têm sido amplamente utilizados, desde épocas antigas, na indústria alimentícia e de fármacos. Estes corantes, além de sua cor atrativa, podem igualmente mostrar atividade biológica, a qual pode ser uma resposta da planta aos estímulos ambientais tais como o ataque de insetos, fungos ou microrganismos. Daqui, acredita-se que alguns desses corantes possam exibir atividades biológicas benéficas (KAPADIA et al., 1997).

Atualmente, o interesse por pesquisas em fontes de extração, estabilidade e rendimento de corantes naturais têm se difundido em virtude das suas propriedades potenciais para aplicações, nos mais diversos ramos da ciência e tecnologia, que incluem desde a sua utilização como aditivo com poder tintorial para alimentos, tintas e indústria têxtil, até atividade biológica e antioxidante com uso principalmente na indústria farmacêutica e de cosméticos.

As clorofilas, pigmentos verdes muito comuns em plantas, verduras, legumes e várias frutas têm sido bastante utilizadas tanto como pigmentos quanto como aditivo com potencial biológico, devido à sua cor e as suas propriedades físico-químicas favoráveis. Este pigmento, quando 100% clorofila, não é estável e é insolúvel em água (STREIT et al., 2005). Por este motivo, a clorofila é submetida à hidrólise alcalina, que saponifica a ligação éster do fitol presente em sua estrutura e abre o anel da ciclopentanona. Em uma síntese adicional o átomo central de Mg contido na molécula de clorofila é substituído por um átomo de Cu. Tal procedimento origina o derivado da clorofila denominado clorofilina cúprica de sódio, um corante que apresenta alta estabilidade ao calor e à luz, é mais resistente aos agentes oxidativos em geral e é altamente solúvel em água (HOUSE & SCHNITZER, 2008).

A clorofila natural e a clorofilina cúprica de sódio têm sido largamente investigadas pela gama de atividades biológicas benéficas, incluindo: cicatrização de pele, propriedades anti-inflamatórias e atividade anti-mutagênica, podendo atuar ainda, como fotossintetizadores possibilitando a utilização como agentes efetivos na terapia fotodinâmica do câncer (FERRUZI et al., 2002; LÓPEZ-CARBALLO et al., 2008; FERRUZZI & BLAKESLEE, 2007)

Desta forma, estudos atuais visam desenvolver produtos aplicáveis que possam somar as propriedades biológicas benéficas de substâncias corantes às propriedades de materiais poliméricos.

Entre os materiais poliméricos, as blends de polímeros naturais e sintéticos têm se mostrado uma alternativa viável, para aplicação em

plásticos de engenharia, com aplicação principalmente nas indústrias automobilística e eletro-eletrônica, e em engenharia de tecidos, pois é possível trabalhar diversas propriedades a fim de viabilizar as características específicas de cada aplicação (COSTA-JÚNIOR & MANSUR, 2008).

A quitosana (poli- β (1,4)-D-glucosamina), um polissacarídeo catiônico, é um polímero de origem natural, obtido pela desacetilação alcalina da quitina. Como combina uma série de propriedades como a biodegradabilidade, bioatividade, biocompatibilidade, não toxicidade e propriedades anti-fúngicas e anti-bacteriais, a quitosana e seus análogos modificados mostraram muitas aplicações na medicina, cosméticos, engenharia de tecidos entre outras (YANG et al., 2004). Entretanto sua resistência mecânica e sua maleabilidade são limitadas principalmente para aplicação como filmes em bandagens, por exemplo, e por isso a mistura da mesma com outros polímeros é um procedimento utilizado para alterar ou obter as propriedades de interesse (COSTA-JÚNIOR & MANSUR, 2008).

O Poli(álcool vinílico) (PVA) é um polímero sintético, biodegradável, inócuo, não-carcinogênico, atóxico e que apresenta boas propriedades biocompatíveis, além de uma excelente habilidade na formação de filmes. Por apresentar boas propriedades na formação de filmes, alta hidrofiliabilidade, e estabilidade química proeminente a sua utilização em blendas poliméricas combinadas com polímeros naturais tem sido alvo de muitos estudos. É útil em várias aplicações tais como: sistema de liberação controlada de drogas, adesivos, emulsificantes e “scaffolds” na engenharia de tecidos.

Por causa das boas atividades biológicas da quitosana e PVA, a combinação desses dois polímeros pode ter efeitos benéficos nas características biológicas dos filmes da mistura (TRIPATHI et al., 2009). Além de que, as interações intermoleculares entre quitosana e PVA na mistura, promovem propriedades mecânicas desejáveis para inúmeras aplicações (YANG et al., 2004).

A introdução de nanopartículas de óxidos de metais em matrizes poliméricas também pode ser um contribuinte para potencializar as propriedades bactericidas destes materiais. Estudos realizados por Zhang e colaboradores (2008), e Tam e colaboradores (2008), mostram o poder antibacteriano de tais compostos inorgânicos, em especial do ZnO.

Assim, este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de filmes de blendas de QTS/PVA incorporadas com clorofilina cúprica de sódio e adicionadas de nanopartículas de ZnO, através do método de evaporação de solvente, a fim de se obter produtos com potenciais usos

na indústria farmacêutica, principalmente como bandagens na cicatrização de feridas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Corantes Naturais

Muitos corantes, naturais e sintéticos, são utilizados em alimentos, fármacos e cosméticos (KAPADIA et al., 1998). Segundo o artigo 10 do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965 (BRASIL, 2002b), considera-se corante natural, o pigmento ou corante inócuo extraído de substância vegetal ou animal. Já o corante artificial é a substância obtida por processo de síntese (com composição química definida).

Nos últimos anos, o interesse no uso de corantes naturais aumentou consideravelmente, principalmente pela sua aparente falta de toxicidade e porque estas substâncias corantes, sendo originadas de plantas ou insetos, são constantemente renováveis e ambientalmente mais seguras (KAPADIA et al., 1997).

Os corantes naturais podem ser divididos em três grupos principais. Os compostos heterocíclicos com estrutura tetra-pirrólica, que compreendem as clorofilas presentes em vegetais, o heme e as bilinas encontradas em animais. Os compostos de estrutura isoprenóide, representados pelos carotenóides, encontrados em animais e principalmente em vegetais, e os compostos heterocíclicos contendo oxigênio, como os flavonóides, que são encontrados exclusivamente em vegetais. Além desses existem outros dois grupos de corantes presentes unicamente em vegetais: as betalaínas, que são compostos nitrogenados, e os taninos, que agrupam diversos compostos de estruturas altamente variáveis (CONSTANT et al., 2002).

São muitos os aditivos corantes derivados de fontes naturais obtidos pela extração química ou física, entretanto, observa-se atualmente que as estas substâncias apresentam alguns inconvenientes para a aplicação em alimentos. As cores violeta e roxa das antocianinas são sensíveis à oxidação, sofrem descolorimento pelo dióxido de enxofre e variam com o pH, limitando sua aplicação em alimentos e bebidas ácidas. Também, as betaninas, carotenóides e clorofilas contêm hidrogênios lábeis e são facilmente descoradas pela oxidação, tornando-os sensíveis à luz, calor e oxigênio. Estas características limitam o vigor destes aditivos de cor durante o processamento, o armazenamento e a exposição dos alimentos aos quais foram adicionados. O corante de alimentos curcumina tem um problema diferente, a curcumina é o pigmento principal da cúrcuma e carrega um sabor picante, que limita o seu uso como substância corante de alimentos (MAPARI et al., 2005).

Em contrapartida, uma série de corantes naturais pode exibir atividades biológicas e farmacológicas benéficas, apresentando diversas vantagens como atividade antiinflamatória, antioxidante, antibacteriana, propriedades quimioterápicas e quimiopreventiva para o tratamento de câncer e tratamento de doenças cardiovasculares entre outras (FERRUZZI & BLAKESLEE, 2007; KIM et al., 2006; SHARMA et al., 2005; SHANG et al., 2010; MOTTERLINI et al., 2000), abrindo assim um leque para as mais variadas aplicações no campo tecnológico.

2.2 O Pigmento Natural Clorofila

As clorofilas são os pigmentos naturais verdes mais abundantes presentes nas plantas e ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais. Estes pigmentos possuem tom verde oliva e são obtidas de vegetais ou parte de vegetais como a grama, lucerne e urtiga. As clorofilas participam do processo de fotossíntese das plantas e mais de cem estruturas de seus derivados já foram descritas, as quais advêm de diversas fontes, dentre elas plantas, algas verdes e organismos procariontes (VOLP et al., 2009). O processo de fotossíntese serve para a produção fotoquímica de matéria orgânica e para a liberação de oxigênio em todas as plantas autotróficas, isto é, aquelas capazes de sintetizar o próprio alimento.

Em plantas maiores ou superiores e muitas algas, as clorofilas ocorrem em organelas subcelulares, denominadas cloroplastos. Em bactérias fotossintéticas as clorofilas são localizadas em unidades macromoleculares, os cromatóforos. Geralmente, estão associadas a pigmentos carotenóides amarelos e às vezes a componentes vermelhos ou azuis, protéicos, como em certas espécies de algas (SOARES, 2006).

Quimicamente, a clorofila não é uma molécula isolada, mas compreende uma família de substâncias semelhantes entre si, designadas de clorofila a, b, c e d. Estruturalmente são moléculas complexas, pertencentes à classe das porfirinas, formadas por 4 anéis pirrólicos e um quinto anel isocíclico, localizado ao lado do terceiro anel pirrólico. Os anéis estão ligados entre si por pontes metilênicas e a molécula contém um átomo de magnésio no seu interior, coordenado aos anéis. No quarto anel pirrólico, o ácido propiônico ali existente é esterificado por um álcool acíclico de cadeia longa, geralmente o fitol, conferindo à clorofila um caráter hidrofóbico (LANFER-MARQUEZ, 2003).

Dois tipos de clorofila, conhecidos como clorofila a e clorofila b, estão presentes em plantas terrestres, outros tipos estão presentes em algas e algumas bactérias. A clorofila a e b diferem uma da outra na

substituição em uma posição do núcleo tetrapirrólico, a clorofila a tem um grupo metila enquanto a clorofila b tem um grupo formila, no carbono C-3, Figura 1 (MORTENSEN & GEPPEL, 2007).

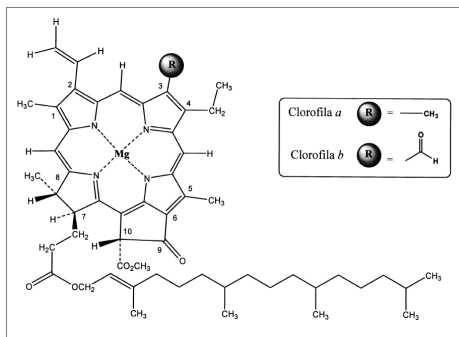


Figura 1: Estrutura química da clorofila a e clorofila b.

As ligações entre as moléculas de clorofila são muito frágeis (não-covalentes), rompendo-se com facilidade ao macerar o tecido em solventes orgânicos. As clorofilas são insolúveis em água e os solventes mais eficazes para sua extração são os solventes polares como a acetona, o metanol, o etanol, o acetato de etila, a piridina e a dimetilformamida. Os solventes apolares como o hexano e o éter de petróleo são os menos eficazes. No caso das clorofilas a e b, o aumento da polaridade da clorofila b em relação à clorofila a deve-se ao substituinte aldeído. Estes pigmentos são quimicamente instáveis e podem ser alterados ou destruídos facilmente, modificando o aspecto e a qualidade dos produtos. Em geral, as clorofilas são relativamente instáveis e sensíveis à luz, aquecimento, oxigênio e a degradação química (STREIT et al., 2005).

A clorofilina cúprica de sódio é um dos derivados da clorofila, que é formada pela substituição do átomo central de magnésio por um átomo de cobre e saponificação por tratamento alcalino (FARAG, 2006; MORTENSEN & GEPPEL, 2007). Este derivado da clorofila possui alta estabilidade ao calor e à luz, é mais resistente aos agentes oxidativos em geral e é altamente solúvel em água o que viabiliza a sua utilização para preparar produtos enriquecidos (GIOVINE & FABIETTI, 2005). A Figura 2 mostra a estrutura química da clorofilina cúprica de sódio.

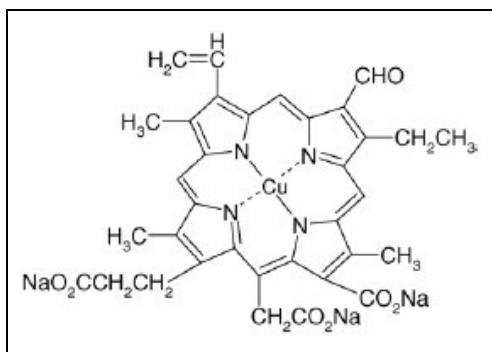


Figura 2: Estrutura química da clorofilina cúprica de sódio.

A clorofila e seus derivados têm longa história estabelecida pelo seu uso na medicina tradicional e por finalidades terapêuticas. Ambos, a clorofila natural e seus derivados de grau comercial, tais como a clorofilina cúprica de sódio (Figura 2), têm sido largamente investigados pela grande gama de atividades biológicas benéficas incluindo: cicatrização de pele, propriedades antiinflamatórias, controle de cristais de oxalato e desodorização interna (LÓPEZ-CARBALLO et al., 2008; FERRUZZI & BLAKESLEE, 2007). Entre outras aplicações, através destas propriedades, a clorofila natural e a clorofilina cúprica de sódio podem atuar como fotossintetizadores possibilitando a utilização como agentes efetivos na terapia fotodinâmica do câncer (FERRUZZI & BLAKESLEE, 2007).

2.3 Blendas Poliméricas

É denominada blenda polimérica, a mistura de dois ou mais polímeros sem que haja reação química entre eles. A mistura de polímeros é uma rota conveniente para o desenvolvimento de novos materiais poliméricos, capazes de render propriedades superiores às propriedades dos polímeros individuais, como a melhoria das propriedades físicas, químicas e de processamento. Este método é geralmente mais rápido e barato para a criação de novos materiais poliméricos do que o desenvolvimento de novos monômeros e/ou novas rotas de polimerização. Uma vantagem adicional da mistura de polímeros consiste no fato de que as propriedades dos materiais podem ser adaptadas combinando polímeros componentes e mudando a composição da mistura (HE et al., 2004).

As propriedades das blendas poliméricas são determinadas pela miscibilidade dos componentes e estrutura. Quando a mistura física de polímeros dá origem a um sistema miscível, forma-se uma mistura homogênea, onde existem fortes interações intermoleculares entre os componentes da mistura. Entretanto, há um predomínio de sistemas imiscíveis, que resultam em uma estrutura heterogênea, com a formação de duas ou mais fases, cujas propriedades e performance das blendas dependem da dispersão dos domínios nas matrizes e das forças de interações entre os componentes da mistura.

Embora a maioria das misturas de polímeros seja imiscível ou apenas parcialmente miscível, diversas combinações têm apresentado boas propriedades mecânicas e térmicas entre outras, as quais são úteis em determinadas aplicações. Tais misturas são ditas compatíveis (FEKETE et al., 2005). Um grande número de blendas imiscíveis, porém compatíveis, tem despertado considerável interesse comercial nos últimos anos.

2.4 Biopolímero Quitosana

A quitosana é um copolímero formado por unidades 2-desoxi-N-acetil-D glucosamina e 2-desoxi-D-glucosamina unidas por ligações glicosídicas β -1 4, Figura 3, obtido pela desacetilação alcalina da quitina, o componente principal do exoesqueleto de crustáceos. (KITTUR & THARANATHAN, 2003).

De acordo com o grau médio de acetilação, parâmetro empregado para caracterizar o conteúdo médio de unidades N-acetil-D-glucosamina de quitina e quitosana, pode-se obter quitosana com diferentes características, variando-se assim, suas propriedades físico-químicas, como solubilidade, pKa e viscosidade (SINGLA & CHAWLA, 2001). Geralmente, é difícil de obter quitosana com elevado grau de desacetilação, pois, à medida que este aumenta, aumenta-se também a possibilidade de degradação do polímero (DUNG et al., 1994). Desta forma, qualquer polímero quitina que possua um grau de desacetilação maior que 60%, já pode ser considerado quitosana (TAN et al., 1998).

A quitosana é uma base fraca e apresenta-se insolúvel em água, entretanto, é possível solubilizá-la em soluções aquosas de ácidos orgânicos, tais como os ácidos acético, fórmico e cítrico, e em ácidos inorgânicos diluídos como os ácidos clorídrico, nítrico e perclórico, que podem converter unidades de glucosamina na forma solúvel $R-NH_3^+$ (OKUYAMA et al., 2000; QIN et al., 2006). Os grupos amino presentes na cadeia polimérica, conferem à quitosana um caráter de polieletrólito

catiônico ($pK_a \approx 6,5$), fazendo com que o polímero seja solúvel em soluções com o $pH < 6,5$ (KRAJEWSKA, 2004).

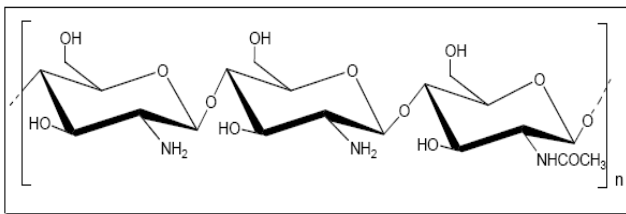


Figura 3: Estrutura química da quitosana.

A combinação de propriedades da quitosana como a bioatividade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade, hidrofiliabilidade e atividade antifúngica e antibacteriana, tem exibido potencial para diversas aplicações na medicina, cosméticos, agricultura, engenharia de tecidos e sistema de liberação controlada de drogas entre outras, sendo utilizada na forma de filmes, géis e esferas (YANG et al., 2004; RINAUDO, 2006; CASARIEGO et al., 2009; LARANJEIRA & FÁVERE, 2009). Dentre os usos, a quitosana tem sido amplamente utilizada como adsorvente, por possuir uma grande quantidade de grupos amino e hidroxila em sua cadeia polimérica mostrando um alto potencial para a adsorção de corantes e íons metálicos (UZUN, 2006; CHIOU & CHUANG, 2006; CAMPANA-FILHO et al., 2007; KIMURA et al., 1999; JUSTI et al., 2004).

2.5 Poli(álcool vinílico) (PVA)

O poli(álcool vinílico), Figura 4, é um polímero semicristalino, biodegradável e solúvel em água, tem sido amplamente utilizado em função de sua flexibilidade e boa capacidade de formar filmes (SREEDHAR et al., 2005). A solubilidade deste polímero em água é influenciada, principalmente pelo grau de hidrólise e peso molecular.

Uma vez que o PVA é obtido pela hidrólise do poli(acetato de vinila), tipos diferentes de PVA podem ser produzidos dependendo do grau de hidrólise envolvido, que corresponde à diferentes quantidades de grupos hidroxilas no polímero, podendo ser classificado em parcialmente hidrolisado e totalmente hidrolisado (MARIA et al., 2008; DEMERLIS & SCHONEKER, 2003). Um aumento no grau de hidrólise implica na redução da solubilidade do polímero em água, associada à

estabilização energética promovida pelas ligações de hidrogênio intra e intercadeias poliméricas, e no aumento da adesão em superfícies hidrofílicas, da viscosidade e da resistência à tração (COSTA-JÚNIOR & MANSUR, 2008). Uma solubilidade ótima acontece em percentual de hidrólise na faixa de 87% a 89%, porém, para a dissolução total em água, o PVA requer aquecimento em temperaturas de aproximadamente 100°C por um período de 30 min.

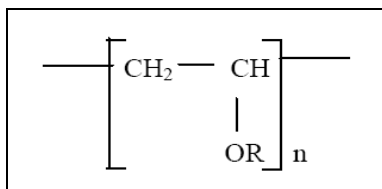


Figura 4: Estrutura química do PVA, onde R = H ou COCH₃.

O PVA é um dos poucos polímeros semicristalinos solúveis em água com boas características interfaciais e mecânicas e elevada resistência à passagem de oxigênio (ARANHA & LUCAS, 2001). A biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade, propriedades excelentes na formação de filmes mesmo quando combinado com outros polímeros sintéticos ou naturais, são também características importantes deste polímero (TRIPATHI et al., 2009). O PVA tem sido utilizado para as mais diversas aplicações, como em fibras, adesivos, emulsificantes, carregador de medicamentos, “scaffolds” na engenharia de tecidos e como plastificante em filmes contendo QTS. Possui ainda, uma ampla aplicação na biomedicina e ciências farmacêuticas, por apresentar uma adesão muito boa aos tecidos biológicos, biodegradabilidade e habilidade de intumescência, além de ser um material não-tóxico (MARTINELLI et al., 2006; DEMERLIS & SCHONEKER, 2003).

2.6 Aditivo Inorgânico: Nanopartículas de ZnO

A nanotecnologia tornou-se uma prioridade significativa em muitos países. A nanotecnologia pode ser usada pra modificar materiais em nano-escala (<100 nm) a fim de criar propriedades novas. Mudanças nas propriedades físico-químicas e estruturais dos materiais, causados pela diminuição no tamanho de partícula podem conduzir a novos efeitos biológicos (KASEMETS et al., 2009).

As nanopartículas de óxidos de metais são usadas cada vez mais em vários produtos de consumo, tais como protetores solares,

cosméticos, enchimentos dentais e materiais têxteis (KASEMETS et al., 2009). Em particular, o semicondutor óxido de zinco (ZnO) é um material versátil para a aplicação em sensores, fotocatalise, células solares, eletrodos transparentes, dispositivos eletroluminescentes e principalmente como agente bactericida em muitas formulações (ZHANG et al., 2009).

No ano de 1950, cientistas já haviam começado as pesquisas sobre o ZnO como um material antibacteriano. Recentemente, cada vez mais os investigadores têm empreendido os estudos nas atividades antibacterianas dos óxidos de metal. O real movimento de uso do ZnO como agente antimicrobiano foi em 1995, quando Sawai e colaboradores encontraram nos pós de MgO, CaO e ZnO atividade antibacteriana contra alguns tipos de bactérias. Estudos precedentes mostram ainda, que as partículas de ZnO são eficazes para inibir, tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas (ZHANG et al., 2008). Desta forma, a busca por óxido de zinco com tamanho de partícula em escala nanométrica, característica esta que leva a obtenção de materiais de alta performance tem levado ao desenvolvimento de vários métodos químicos em escala de laboratório.

Entre os vários métodos de síntese química que vem sendo utilizado para a preparação de nanopós de ZnO podemos citar o método de solgel, o spray pirólise, reação por combustão via líquida, SHS, síntese hidrotérmica, spray-drying e o método Pechini (COSTA et al., 2007). Entre esses métodos, o método Pechini tem se destacado como um processo alternativo e promissor para obtenção de pós nanométricos, com tamanho de partícula controlado, alta pureza e homogeneidade química, além de apresentar um custo relativamente baixo e não necessitar de aparelhagem sofisticada para sua realização (COSTA et al., 2006).

O método Pechini, também chamado método dos precursores poliméricos baseia-se na formação de uma resina polimérica produzida pela poliesterificação entre um complexo metálico quelatado usando ácidos hidroxicarboxílicos (como ácido acético, ácido maleico ou ácido cítrico) e um álcool polihidróxi como o etileno glicol. Durante o aquecimento em temperaturas moderadas ocorrem as reações de esterificação e poliesterificação, havendo assim a formação da resina polimérica, após a remoção do excesso de água. O aquecimento da resina polimérica acima de 300°C causa a quebra do polímero e a expansão da resina forma o que se denomina “puff”. O “puff” ou resina expandida constitui-se de um material semicarbonizado, mostrando um reticulado macroscópico e frágil semelhante a uma espuma. O polímero

formado apresenta grande homogeneidade na dispersão dos íons metálicos e um tratamento térmico adequado é realizado para a eliminação da parte orgânica e obtenção da fase cerâmica desejada (COSTA et al., 2007).

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é desenvolver e caracterizar filmes de blendas de QTS/PVA incorporados com CCS e filmes de blendas de QTS/PVA incorporados com CCS e nanopartículas de ZnO, com a finalidade de obter formulações plausíveis de aplicações na área farmacológica, no que diz respeito ao seu uso como bandagem em cicatrização de feridas.

3.2 Objetivos Específicos

- Preparação de nanopartículas de ZnO pelo método dos precursores poliméricos;
- Caracterização das nanopartículas de ZnO pelas técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (FEG) e Análise de Energia Dispersiva de Raio X (EDX);
- Preparação de filmes de blendas de QTS/PVA em diferentes proporções pela técnica de evaporação de solvente;
- Incorporação de diferentes quantidades de CCS nas diferentes composições de blendas de QTS/PVA formadas;
- Adição de nanopartículas de ZnO às blendas poliméricas de QTS/PVA incorporadas com CCS;
- Caracterização dos filmes de blendas pelas análises de: Espectroscopia no Infravermelho (IV), Análise Termogravimétrica (TG), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-EDX), determinação do Grau de Intumescimento (GI) e determinação das Propriedades Mecânicas.
- Teste de atividade antibacteriana dos filmes de blendas formados.

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

A quitosana foi adquirida da Purifarma Comp. (São Paulo, Brasil), com grau de desacetilação de 90% e massa molar média de 122.400 g.mol⁻¹. O poli(álcool vinílico) com grau de hidrólise entre 87-89% e massa molar média de 85.300 g.mol⁻¹ foi adquirido da VETEC (Rio de Janeiro, Brasil). O corante de clorofila convertido em clorofilina cúprica de sódio (C-100000-WS-P) com grau de pureza superior a 95% foi fornecido pela Christen – Hansen Ind. & Com. Ltda. O ZnO, com grau de pureza de 98% foi adquirido da Vetec. Todos os outros reagentes são de grau analítico.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação de nanopartículas de ZnO.

As nanopartículas de ZnO foram obtidas de acordo com o método dos precursores poliméricos (COSTA et al., 2007). O processo de síntese consistiu na dissolução de 3g de ácido cítrico em 200 mL de água destilada sob agitação constante e temperatura de 60°C. A esta solução foi adicionado aos poucos óxido de zinco na proporção 2:1 em relação ao ácido cítrico, e ácido nítrico foi acrescentado para ajudar na dissolução (aproximadamente 2,0 mL). A temperatura foi elevada para 70°C e foi adicionado etileno glicol na razão 40/60 (% em massa) em relação ao ácido cítrico. Para ocorrer a formação de uma resina polimérica (poliesterificação) e vaporização da água a temperatura foi elevada para 90°C. A resina polimérica foi aquecida a 350°C por 1h em uma mufla (marca Jung), resultando na expansão da resina, no que se denomina “puff”. Esta resina foi resfriada e triturada. O pó resultante foi calcinado à 500°C por 1h para eliminar a parte orgânica, restando apenas as nanopartículas de ZnO.

4.2.2 Preparação de filmes de blendas de QTS/PVA e QTS/PVA incorporados com CCS.

Neste estudo, foram previamente testados a preparação de filmes de QTS/PVA incorporadas com CCS através da técnica de impregnação do corante em filmes de QTS/PVA nas proporções 3:1, 3:2 e 1:1, já preparados. Entretanto esta técnica não se mostrou viável tendo

em vista que o corante na presença de água e soluções tampão (pH 7,0; 7,5; 8,0; 8,5) quando colocado sobre os filmes provocou um grau de intumescimento elevado, ocasionando a quebra do filme em virtude do seu aumento de tamanho, impossibilitando a preparação de filmes por esta técnica. Para evitar o elevado grau de intumescimento e conseqüentemente a quebra dos filmes, os mesmos foram deixados por um intervalo de tempo menor (cerca de 30 min) em contato com as soluções contendo o corante, porém foi observado, ainda, que quando realizada a evaporação do solvente dos filmes, houve a formação de filmes na forma de plásticos rígidos e enrugados, inviabilizando a sua aplicação em bandagens para cicatrização de feridas. Outra tentativa, foi a adição de CCS em uma solução de PVA dissolvido em água, e posterior mistura com uma solução de QTS em ácido acético. Porém esta metodologia também se mostrou inviável para a aplicação citada, tendo em vista a precipitação tanto do corante quanto da quitosana quando as soluções foram misturadas.

Em virtude dos problemas citados acima uma metodologia alternativa foi proposta para a preparação de filmes de blendas QTS/PVA incorporadas com CCS. Todos os filmes desenvolvidos neste estudo foram então, obtidos através da técnica de “casting” (evaporação do solvente), sendo preparados a partir da dissolução da QTS em uma solução de ácido acético 2% sob agitação constante e dissolução do PVA em uma solução tampão $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ $0,1\text{mol.L}^{-1}$ (pH 5,5) sob agitação constante de modo a obter blendas poliméricas nas proporções de QTS/PVA 3:1, 3:2 e 1:1, sendo que a massa total de polímeros utilizada foi de 2g.

Os filmes nas três proporções acima citados foram enriquecidos com CCS 2,5% e 5% (m/m) (50mg e 100mg, respectivamente). Para tal, o corante foi dissolvido em uma pequena quantidade de água destilada (2 a 3 mL) e adicionado lentamente à solução de PVA dissolvido no tampão acetato pH 5,5 ($\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ $0,1\text{mol.L}^{-1}$) sob agitação constante e temperatura ambiente. Posteriormente, a solução contendo o polímero PVA e a CCS foi agregada, aos poucos, à solução de QTS sob agitação constante e pouco vigorosa.

Após a completa homogeneização das soluções filmogênicas, as mesmas foram vertidas em placas de Petri (150 mm de diâmetro por 15 mm de altura) e secas à temperatura ambiente. Após a evaporação do solvente os filmes foram acondicionados para as posteriores análises.

4.2.3 Preparação de filmes de blendas de QTS/PVA incorporados com CCS e nanopartículas de ZnO.

Na preparação destes filmes foi dissolvido 1g de PVA em 25 mL de tampão $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$ 0,1mol.L⁻¹ (pH 5,5) sob agitação constante e temperatura de 70°C. Após a completa dissolução do polímero a solução formada foi resfriada até aproximadamente 25°C quando foram adicionadas nanopartículas de ZnO (100mg e 150mg, para formar filmes com 5% e 7,5% (m/m), respectivamente na solução filmogênica final) sob agitação até a completa dispersão. Posteriormente, a esta solução, foram adicionados lentamente 100mg (5% m/m) de CCS previamente dissolvida em 2 à 3 mL de água destilada. A solução resultante ficou sob agitação por aproximadamente 4h em temperatura ambiente, para garantir uma boa dispersão e homogeneização do material. Separadamente, foi dissolvido 1g de QTS em 25 mL de ácido acético 2%. A esta solução, foi adicionado lentamente sob agitação, a solução composta de PVA, CCS e ZnO. As soluções filmogênicas resultantes foram vertidas em placas de Petri (150 mm de diâmetro por 15 mm de altura) e secas à temperatura ambiente. Desta forma, foram obtidos filmes de blendas de QTS/PVA 1:1 incorporados com 5% de CCS e com 5% e 7,5% de ZnO.

Tabela 1: Denominações e composições dos filmes de blendas.

Filmes	Composições
QTS/PVA 3:1	1,5g de QTS e 0,5g de PVA
QTS/PVA 3:2	1,2g de QTS e 0,8g de PVA
QTS/PVA 1:1	1,0g de QTS e 1,0g de PVA
QTS/PVA 3:1 – CCS(1)	1,5g de QTS, 0,5g de PVA e 0,05g de CCS
QTS/PVA 3:2 – CCS(1)	1,2g de QTS, 0,8g de PVA e 0,05g de CCS
QTS/PVA 1:1 – CCS(1)	1,0g de QTS, 1,0g de PVA e 0,05g de CCS
QTS/PVA 3:1 – CCS(2)	1,5g de QTS, 0,5g de PVA e 0,1g de CCS
QTS/PVA 3:2 – CCS(2)	1,2g de QTS, 0,8g de PVA e 0,1g de CCS
QTS/PVA 2:1 – CCS(2)	1,0g de QTS, 1,0g de PVA e 0,1g de CCS
QTS/PVA 1:1 – CCS(2) – ZnO(1)	1,0g de QTS, 1,0g de PVA, 0,1g de CCS e 0,1g de ZnO
QTS/PVA 1:1 – CCS(2) – ZnO(2)	1,0g de QTS, 1,0g de PVA, 0,1g de CCS e 0,15g de ZnO

4.2.4 Técnicas Empregadas na Caracterização das Nanopartículas de ZnO

4.2.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (FEG)

Foi empregada para caracterizar a morfologia externa das nanopartículas de ZnO sintetizadas, bem como avaliar o seu tamanho utilizando-se um Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL JSM – 6701F) de alta resolução.

4.2.4.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X (EDX)

A análise elementar obtida por EDX foi também utilizada para a caracterização qualitativa das nanopartículas de ZnO obtidas por síntese, sendo estas colocadas sobre estaves e recobertas com carbono. A análise foi feita em um Microscópio Eletrônico de Varredura equipado a detectores de energia dispersiva de raio X (EDX), marca Philips, modelo XL 30.

4.2.5 Técnicas Empregadas na Caracterização dos Filmes de Blendas.

4.2.5.1 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho para todas as amostras de filmes foram obtidos na região de $4000 - 690 \text{ cm}^{-1}$ em um espectrofotômetro FTIR ABB-Bomem, modelo FTLA 2000.

4.2.5.2 Análise Termogravimétrica (TG)

As análises termogravimétricas (TG) e termogravimétrica diferencial (DrTG) para os filmes de blendas, foram realizadas em um Analisador Termogravimétrico Shimadzu TGA 50, sob atmosfera de N_2 (50 mL.min^{-1}), com taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C.min}^{-1}$ até a temperatura de 600°C .

4.2.5.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Os termogramas de todos os filmes foram obtidos usando um Calorímetro Diferencial de Varredura (Shimadzu- DSC50) conectado a

um computador. A razão de aquecimento deste estudo foi de $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ sob um fluxo de N_2 de $50 \text{ mL}.\text{min}^{-1}$.

Os filmes de blendas foram analisados por DSC seguindo as condições de análise acima citadas, porém, as análises foram realizadas em duas corridas. Previamente, foi realizada uma varredura até 130°C , para a evaporação completa da umidade residual presente nas amostras. Em seguida, as amostras foram resfriadas até a temperatura ambiente e realizada uma segunda varredura de 25°C até 230°C . A temperatura de transição vítrea (T_g) para as amostras foi calculada no ponto de inflexão na linha base causada pela variação do calor específico das amostras.

4.2.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-EDX)

A morfologia interna dos filmes de blendas foi avaliada através das micrografias de suas seções transversais, em um Microscópio Eletrônico de Varredura equipado a detectores de energia dispersiva de raio X (EDX), marca Philips, modelo XL 30. Para a realização das análises, uma pequena amostra dos filmes foi fraturada em nitrogênio líquido, colocada sobre estaves e recoberta com uma camada de ouro.

4.2.5.5 Determinação do Grau de Intumescimento (GI)

Para o estudo de intumescimento dos filmes de blendas, uma área de $1,5 \times 1,5 \text{ cm}$ de cada filme desenvolvido foi colocada em contato com uma solução tampão pH 7,0 (NaH_2PO_4 $0,1 \text{ mol}.\text{L}^{-1}$). Os frascos foram transferidos para uma Incubadora Mini Shaker Marconi, modelo MA 832, e deixados sob agitação de 150 rpm à 25°C , por 24h. Após o contato, os filmes foram retirados da solução, secos com papel adsorvente e pesados. Este procedimento foi realizado em triplicata.

O grau de intumescimento de cada amostra no tempo t foi calculado pela Equação 1:

$$\text{GI} = \frac{W_t - W_o}{W_o} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

onde, W_t refere-se ao peso da amostra no tempo t e W_o refere-se ao peso inicial da amostra.

4.2.5.6 Determinação da Espessura Média dos Filmes

A espessura média de cada filme foi medida em 8 pontos distintos, tomados aleatoriamente, em cada corpo de prova, com micrômetro digital DIGIMESS, modelo Electronic Outside Micrometer, com precisão de 0,001mm.

4.2.5.7 Determinação das Propriedades Mecânicas dos Filmes

Os ensaios de tensão-deformação foram realizados para determinar o comportamento mecânico (tensão máxima na ruptura (σ), deformação específica (DE) e o módulo de elasticidade (E)) de acordo com a norma ASTM D882/97. Os ensaios foram feitos utilizando o analisador de textura, modelo TA.X.Plus e Software Exponent Lite, equipado com uma célula de carga de 30N, distância inicial da probe de 50mm e velocidade de $5\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$. Os resultados obtidos correspondem a uma média no ensaio de 8 corpos de prova (25 x 100 mm) para cada composição.

4.2.5.8 Teste de Atividade Antibacteriana

Foi avaliada a atividade antibacteriana dos filmes de blendas QTS/PVA 1:1, QTS/PVA 1:1 incorporados com 5% de CCS, e QTS/PVA 1:1 incorporados com 5% de CCS e 7,5% nanopartículas de ZnO. Amostras dos filmes foram contaminadas com 200 μL de suspensões bacterianas aquosas de *Staphylococcus aureus* ATCC* 25923 (contendo aproximadamente $4,1 \times 10^3$ UFC/mL) e *Escherichia coli* ATCC 25922 (contendo aproximadamente $3,3 \times 10^3$ UFC/mL). Os microrganismos foram recuperados dos filmes com o auxílio de Petrifilm, logo após a contaminação (t_0), após 1 hora de exposição (t_1) e após 24 horas de exposição (t_{24}). O número de microrganismos foi contado e o resultado, expresso em UFC**, representa a média de duas repetições. Este teste foi realizado no Laboratório de Antibióticos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

* ATCC: American Type Culture Collection

** UFC: Unidade formadora de colônia é um valor que indica o grau de contaminação microbiológica de um ambiente.

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização das Nanopartículas de ZnO

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo (FEG)

Realizou-se, para as nanopartículas de ZnO sintetizadas pelo método dos Precursores Poliméricos (COSTA et al., 2007), a análise de FEG, em virtude de sua alta resolução o que permite uma melhor avaliação da morfologia para partículas nanométricas em relação à análise de MEV. Observa-se, através da micrografia das nanopartículas, Figura 5 (A), que estas exibiram formato esférico, homogêneo e compacto, com a formação de alguns aglomerados. A formação destes aglomerados pode ser causada pelo tamanho nanométrico das partículas que tende a mantê-las unidas.

A Figura 5 (B) mostra uma ampliação da imagem do material obtido, para a avaliação do tamanho das nanopartículas. Constatou-se que as mesmas exibiram tamanhos variando entre 57 e 90 nm, o que indica uma alta eficiência do processo de síntese utilizado.

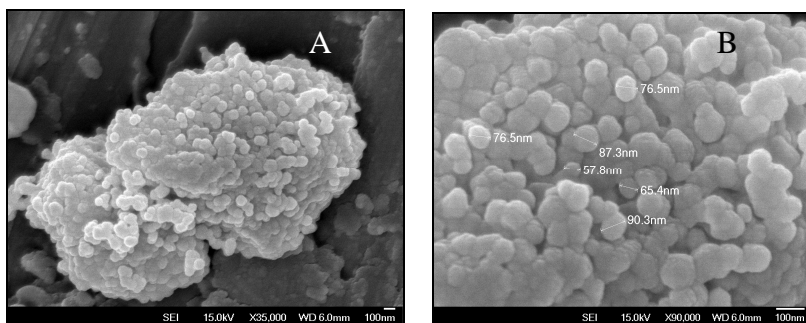


Figura 5: Micrografia das nanopartículas de ZnO obtidas via FEG. Em A) nanopartículas de ZnO com ampliação de 35.000 vezes, e B) medidas das nanopartículas de ZnO com ampliação da imagem em 90.000 vezes.

5.1.2 Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raio X (EDX)

A presente análise teve por objetivo a determinação qualitativa e quantitativa da composição das nanopartículas sintetizadas, utilizando-se detectores de energia dispersiva de raio X (EDX).

Pode-se observar através da Figura 6, que o material obtido apresenta em sua composição apenas os elementos Zn e O, sendo composta por 5,07% de oxigênio e 94,93% de Zn.

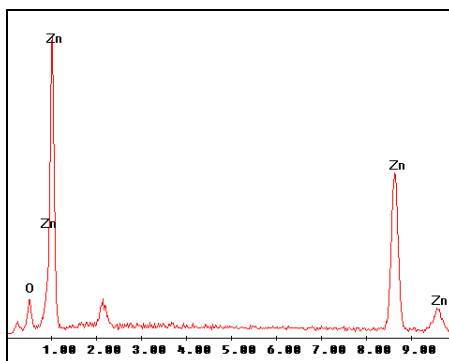


Figura 6: Análise de EDX para as nanopartículas de ZnO.

5.2 Caracterização dos Filmes de Blendas

5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho dos filmes de blendas de QTS/PVA nas proporções 3:1, 3:2 e 1:1 (Figura 7) mostram uma banda larga em torno de 3300 cm^{-1} que pode ser atribuída ao estiramento vibracional do grupo OH em sobreposição com as bandas do grupo NH de amina e amida (VICENTINI et al., 2009) e bandas em 2925 e 2863 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento C-H. Observa-se também a presença de uma banda em torno de 1730 cm^{-1} , devido ao estiramento C=O e C-O proveniente de grupos acetato remanescentes do PVA (reação de saponificação do poli(acetato de vinila) (COSTA-JÚNIOR et al., 2009) que é confirmado pelo aumento da intensidade da banda à medida que aumenta-se o teor de PVA na blenda polimérica. As bandas em 1644 e 1560 cm^{-1} são referentes aos grupos acetamido da quitosana (TRIPATHI

et al., 2009; SRINIVASA et al., 2003). As duas bandas encontradas em 1414 e 1084 cm^{-1} podem ser atribuídas ao grupo C-O. O aumento do teor de PVA na blenda polimérica provoca também um ligeiro aumento na intensidade da banda em torno de 1253 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico de (=C-O-C) proveniente do PVA parcialmente hidrolisado (COSTA-JÚNIOR & MANSUR, 2008).

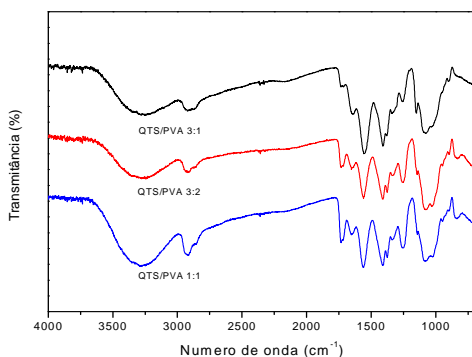


Figura 7: Espectros de Infravermelho dos filmes de blends QTS/PVA em diferentes proporções.

A Figura 8 (A-C) mostra os espectros de infravermelho para os filmes de blends de QTS/PVA contendo CCS(1) e CCS(2). Observa-se de um modo geral, que a adição de clorofilina cúprica de sódio nos filmes poliméricos provocou pequenas mudanças nas bandas de absorção no que diz respeito à sua intensidade. Não foi observado o surgimento de novas bandas com a incorporação de CCS. Nota-se uma diminuição na intensidade das bandas em 1730 cm^{-1} referente ao estiramento C=O e C-O, e em 1253 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico (=C-O-C) ambas correlacionadas ao polímero PVA, sendo que esta diminuição fica mais evidente à medida que aumenta-se o teor de PVA nos filmes, indicativo de provável interação entre os grupos acetato do PVA e grupos aldeído da CCS.

Observa-se também um ligeiro aumento na intensidade da banda em 1559 cm^{-1} , devido à vibração do grupo C=C do sistema macrocíclico tetrapirrólico altamente conjugado e vibrações C=N da CCS. Outra possibilidade é que este aumento na intensidade em 1559 cm^{-1} pode estar relacionado ao grupo C=O da clorofilina indicando uma possível interação entre os grupamentos NH_3^+ da quitosana e os íons carboxilatos da clorofilina cúprica de sódio.

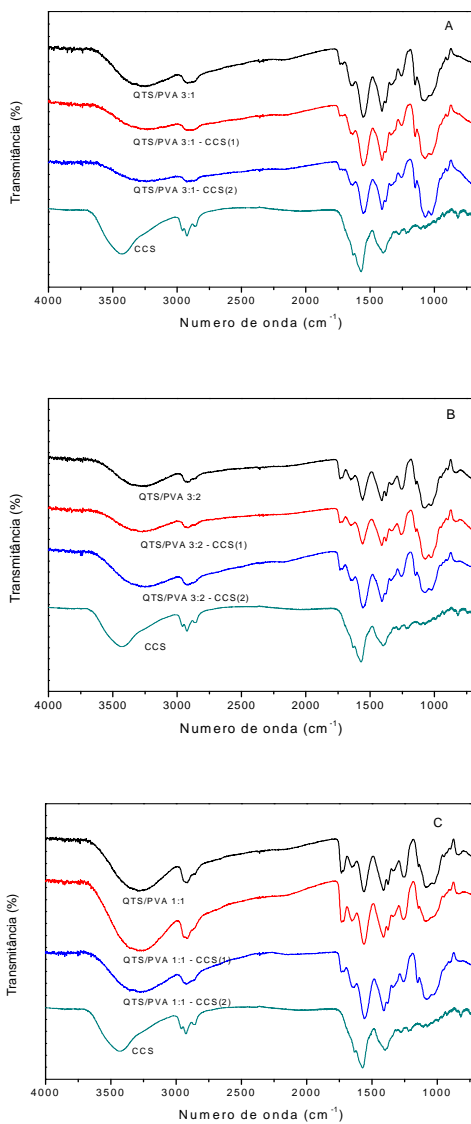


Figura 8: Espectros de infravermelho para os filmes de blends de QTS/PVA, QTS/PVA incorporados com CCS em diferentes proporções de polímero: (A) 3:1, (B) 3:2 e (C) 1:1 e espectro de infravermelho da CCS.

Foram realizadas ainda, análises de infravermelho para os filmes de blendas de QTS/PVA 1:1 adicionadas de 5% de CCS e nanopartículas de ZnO (5% e 7,5%), (Figura 9). Verifica-se que a banda existente em 1644 cm^{-1} nos filmes de QTS/PVA 1:1 e QTS/PVA 1:1 - CCS(2) torna-se um pequeno ombro quando ocorre a adição de ZnO no filme polimérico e a banda em 1560 cm^{-1} sofre um ligeiro aumento na sua intensidade, sugerindo uma possível interação entre os grupos acetamido da quitosana e o ZnO. Resultados similares são encontrados por Yang e colaboradores (2009) em estudo com membranas de quitosana e TiO_2 .

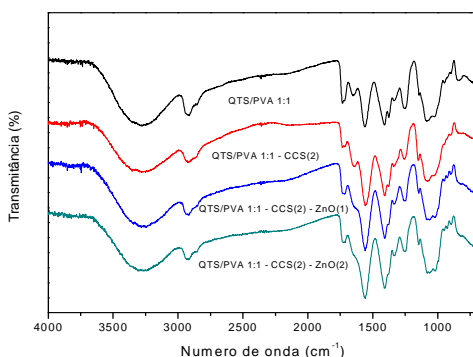


Figura 9: Espectros de infravermelho para os filmes de blendas de QTS/PVA 1:1 incorporados com CCS(2), ZnO(1) e ZnO(2).

5.2.2 Análise Termogravimétrica (TG)

Os filmes de blendas de QTS/PVA, QTS/PVA/CCS e QTS/PVA/CCS/ZnO em diferentes proporções, foram avaliados acerca de sua estabilidade térmica através da análise de TG, sendo o perfil das análises apresentados nas Figuras 10, 11, e 12. Do mesmo modo, os parâmetros termogravimétricos obtidos a partir da análise termogravimétrica diferencial para todos os filmes são apresentados na Tabela 2.

As análises de TG mostram que os filmes contendo apenas QTS e PVA na sua composição apresentam um perfil de degradação térmica em três estágios de perda de massa. O primeiro estágio, em torno de 100°C (Tabela 2), é referente à evaporação de água residual presente nas amostras. O segundo estágio, por volta de 300°C , pode ser atribuída à

degradação da cadeia polimérica da quitosana, envolvendo a desidratação, depolimerização e decomposição pirolítica da estrutura polissacarídea resultando na formação de água, dióxido de carbono, metano e amônia (ZOHURIAAN e SHOKROLAHI, 2004), esta etapa envolve também a desidratação da cadeia polimérica do PVA, acompanhada da formação de alguns produtos voláteis (LEWANDOWSKA, 2009). Em torno de 440°C, é observado o terceiro estágio de perda de massa, que pode ser atribuído à degradação do PVA, em carbono e hidrocarbonetos (LEWANDOWSKA, 2009), Figura 10 (Tabela 2).

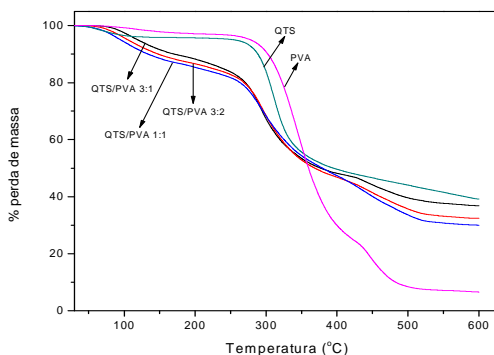


Figura 10: Análise termogravimétrica dos filmes de QTS, PVA e filmes de blendas de QTS/PVA em diferentes proporções.

Tabela 2: Parâmetros Termogravimétricos obtidos para os diferentes filmes de blendas.

Amostra	Estágio 1		Estágio 2		Estágio 3		Massa Residual (%) ^c
	T ₁ ^a	P ₁ ^b	T ₂ ^a	P ₂ ^b	T ₃ ^a	P ₃ ^b	
QTS/PVA 3:1	107	11	292	42	437	11	36
QTS/PVA 3:1 - CCS(1)	110	13	291	39	450	12	36
QTS/PVA 3:1 - CCS(2)	100	14	292	38	453	12	36
QTS/PVA 3:2	104	13	296	40	442	13	34
QTS/PVA 3:2 - CCS(1)	97	12	292	36	441	19	33
QTS/PVA 3:2 - CCS(2)	100	13	292	35	445	18	34
QTS/PVA 1:1	97	17	293	33	443	17	33
QTS/PVA 1:1 - CCS(1)	92	12	299	32	446	19	37
QTS/PVA 1:1 - CCS(2)	100	13	297	39	470	23	25
QTS/PVA 1:1 - CCS(2)-ZnO(1)	105	11	277	32	448	16	41
QTS/PVA 1:1 - CCS(2)-ZnO (2)	127	5	272	32	440	17	46

^a Temperatura de máxima velocidade de degradação (°C)

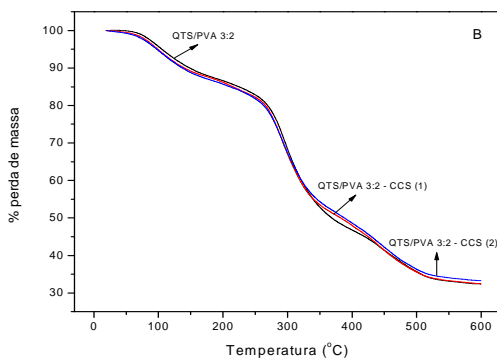
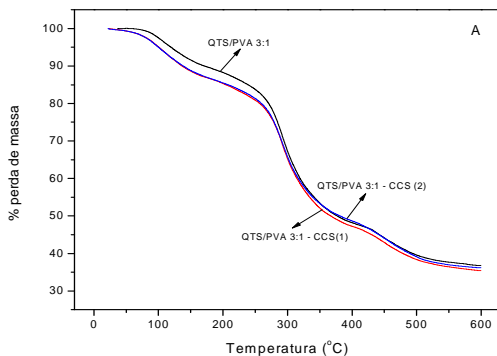
^b Porcentagem de perda de massa em cada estágio de degradação

^c Massa residual a 600°C

A Figura 11 (A-C) mostra o perfil de degradação térmica dos filmes de blendas de QTS/PVA em três diferentes proporções (3:1; 3:2 e 1:1) incorporados com CCS (1) e CCS (2). Pode-se observar através dos termogramas dos filmes e da Tabela 2 que para uma mesma composição de polímero no filme o aumento na quantidade de CCS incorporada provoca um ligeiro aumento na estabilidade térmica do filme, principalmente no terceiro estágio de degradação.

Em geral, os resultados de análise termogravimétrica mostram que a adição de CCS provocou mudanças pouco significativas na estabilidade térmica de filmes de blendas de QTS/PVA, sendo verificada uma maior estabilidade térmica nos filmes contendo uma maior fração do polímero PVA incorporados com 5% de CCS (QTS/PVA 1:1 - CCS (2)), Tabela 2. Isto sugere uma interação da CCS

com o polímero PVA. Devido às interações iônicas do polímero quitosana (QTS) carregado positivamente com o corante clorofilina cúprica de sódio (CCS) forma-se um complexo QTS/CCS. A presença deste complexo no filme de QTS/PVA induz uma interação competitiva entre o PVA e o corante (CCS) no complexo blenda polimérica-corante.



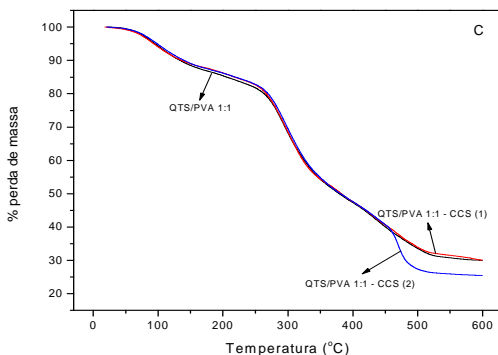


Figura 11: Análise termogravimétrica dos filmes de blendas de QTS/PVA e QTS/PVA incorporados com CCS em diferentes proporções de polímero: (A) 3:1, (B) 3:2 e (C) 1:1.

Os estudos de degradação térmica para as amostras de filmes contendo a blenda polimérica QTS/PVA 1:1 adicionada de 5% de CCS e nanopartículas de ZnO (5% e 7,5%), QTS/PVA 1:1 - CCS(2) - ZnO(1) e QTS/PVA 1:1 - CCS(2) - ZnO(2), respectivamente, mostram que a incorporação de ZnO no filme diminui a sua estabilidade térmica. A Tabela 2, mostra uma diminuição de cerca de 20°C e 22°C no segundo e terceiro estágio de degradação, respectivamente, no que diz respeito à temperatura de máxima velocidade de degradação para o filme QTS/PVA 1:1 - CCS(2) - ZnO(1) e uma diminuição em torno de 25°C e 30°C também no segundo e terceiro estágio de degradação, respectivamente para o filme QTS/PVA 1:1 - CCS(2) - ZnO(2), quando comparado ao filme QTS/PVA 1:1 - CCS(2). É notório que uma maior quantidade de ZnO incorporado, diminui consideravelmente a estabilidade térmica do filme, Figura 12.

Vicentini e colaboradores (2009) em estudo similar com filmes de blendas de QTS/PVA contendo nanopartículas de ZnO, mostram um perfil de degradação contrário aos obtidos neste estudo. Os perfis das curvas de degradação térmica dos filmes contendo nanopartículas de ZnO e CCS na matriz polimérica de QTS/PVA podem sugerir que a diminuição da estabilidade térmica da matriz QTS/PVA parece estar relacionada a uma forte interação entre as nanopartículas de ZnO e a clorofilina cúprica de sódio na blenda polimérica, bem como à formação de diferentes fases na matriz polimérica na presença do ZnO. A redução

da estabilidade térmica é então favorecida pela quebra ou enfraquecimento de ligações de hidrogênio na matriz polimérica.

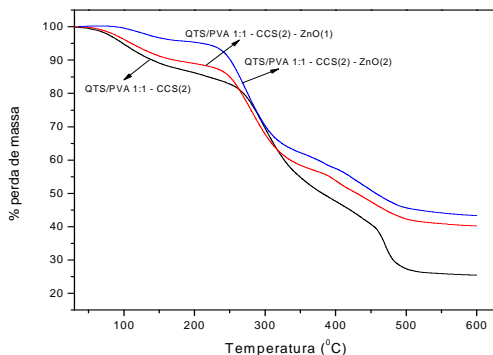


Figura 12: Análise termogravimétrica dos filmes de blendas de QTS/PVA 1:1 incorporados com CCS (2), ZnO(1) e ZnO(2).

5.2.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A Figura 13 apresenta o perfil de DSC para os filmes de blendas de QTS/PVA em três diferentes proporções. Para a análise do comportamento térmico de todas as amostras de filmes obtidos neste estudo foi utilizada a segunda corrida a fim de verificar a transição vítrea (T_g) dos polímeros envolvidos e observar a influência da concentração dos polímeros, da incorporação de CCS e da adição de nanopartículas de ZnO na mesma. Como base para a discussão dos resultados tem-se a T_g do filme de PVA puro em 70°C (T_{g1}) e a T_g do filme de QTS puro em 160°C (T_{g2}), produzidos em água e ácido acético, respectivamente. Lewandowska (2009), observou valores de T_{g1} em torno de 82°C e T_{g2} entre 135-150°C e Mucha et al. (2005) constatarem valores de 70°C e 170°C para a T_{g1} e T_{g2} , respectivamente.

Observa-se através das Figuras 13, 14 e 15, que os filmes de blendas de QTS/PVA analisados neste estudo, apresentaram duas temperaturas de transição vítrea (T_{g1} e T_{g2}) sugerindo a imiscibilidade dos dois polímeros (LEWANDOWSKA, 2009). Os filmes de blendas QTS/PVA formulados em composições diferentes dos referidos polímeros (Figura 13), apresentaram valores de T_{g1} entre 55-60°C

referentes a transição vítrea do polímero PVA, este valor está um pouco abaixo do observado para o filme do polímero puro sugerindo uma interação física entre o PVA e a QTS, vale ressaltar ainda que o abaixamento da temperatura de transição vítrea para este polímero pode estar relacionada ao solvente utilizado para a dissolução do PVA na preparação da blenda polimérica, uma vez que utilizou-se tampão ($\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ 0,1M) e não água pura. Os valores de T_{g2} para estes filmes ficaram entre 155-158°C e estão relacionados ao polímero QTS. Nota-se que há uma pequena diminuição na T_g quando comparado ao filme de quitosana puro, isto pode estar relacionado ao aumento do volume livre entre as cadeias da quitosana provocado pela presença de PVA, uma vez que este atua como um plastificante para a mesma. Mucha et al. (2005), observaram resultados similares em filmes de QTS/PVA em diferentes proporções.

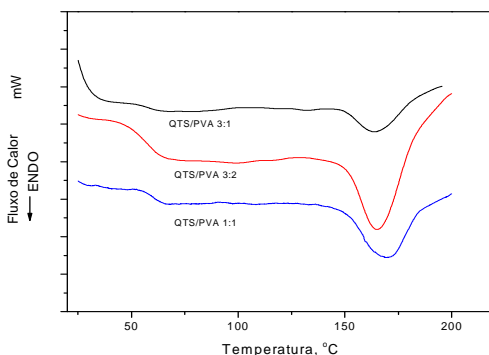


Figura 13: Perfil da análise de DSC para os filmes de blends de QTS/PVA nas proporções 3:1, 3:2 e 1:1.

A Figura 14 (A-C) mostra o perfil das análises de DSC para os filmes de blends de QTS/PVA em três diferentes proporções (3:1; 3:2 e 1:1) incorporadas com CCS (1) e CCS (2). Nota-se, de um modo geral que a incorporação de clorofilina cúprica de sódio nas matrizes poliméricas de QTS/PVA provoca um ligeiro aumento na T_{g1} e uma ligeira diminuição na T_{g2} , independente da razão dos polímeros, sugerindo uma interação entre a CCS e os dois polímeros.

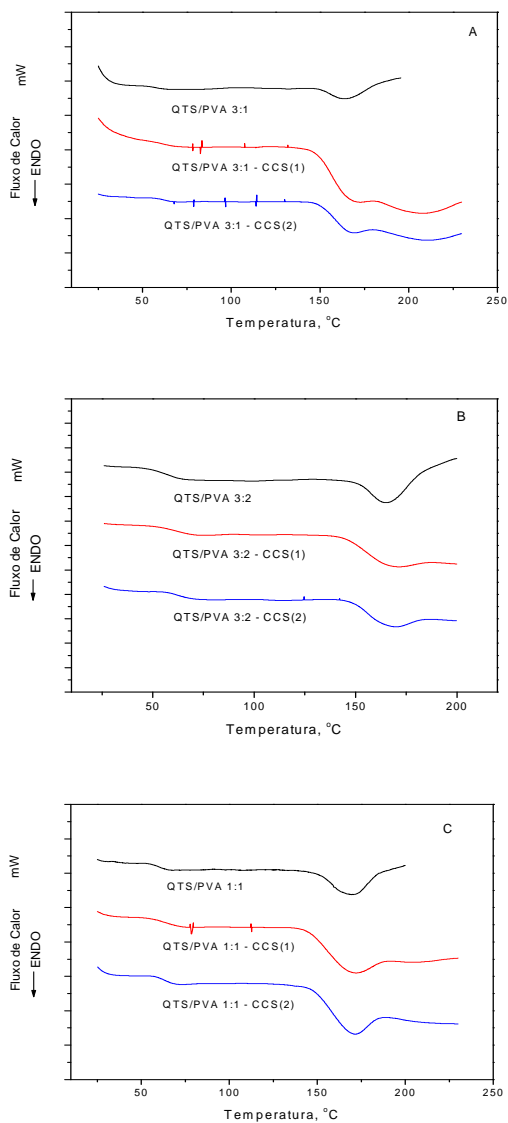


Figura 14: Perfil da análise de DSC para os filmes de blends de QTS/PVA e QTS/PVA incorporados com CCS em diferentes proporções de polímero: (A) 3:1, (B) 3:2 e (C) 1:1.

Do mesmo modo, os filmes de blendas de QTS/PVA 1:1 incorporados com CCS(2), apresentaram um aumento na Tg1 e uma diminuição pouco significativa na Tg2 quando adicionados de nanopartículas de ZnO (Figura 15), quanto maior a quantidade de ZnO no filme, maior é o valor da Tg1. O aumento da Tg1 pode ser atribuído ao fato de que a introdução de material inorgânico na matriz diminui a mobilidade entre as cadeias do polímero (MBHELE et al., 2003). Mbhele et al. (2003), observaram comportamento similar em estudo com filmes de PVA contendo nanopartículas de prata.

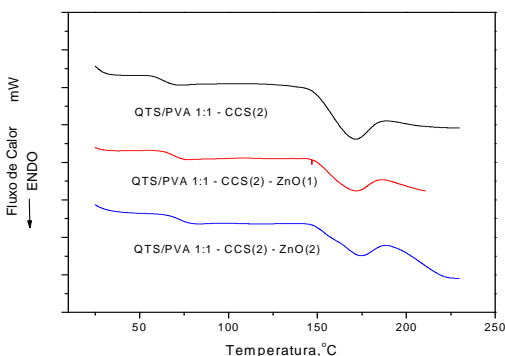


Figura 15: Perfil da análise de DSC para os filmes de blendas de QTS/PVA 1:1 incorporados com CCS(2), ZnO(1) e ZnO(2).

5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As Figuras 16, 17 e 18, apresentam as micrografias da fratura transversal dos filmes de blendas desenvolvidos neste estudo.

A partir da análise das micrografias para os filmes de blendas QTS/PVA em diferentes proporções de polímero, Figura 16 (A-C) observa-se que a estrutura interna dos filmes é densa, sem porosidade aparente e bastante rugosa, o que sugere uma baixa miscibilidade dos polímeros que é confirmada pela análise de DSC.

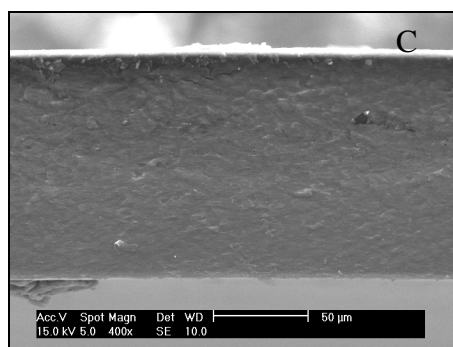
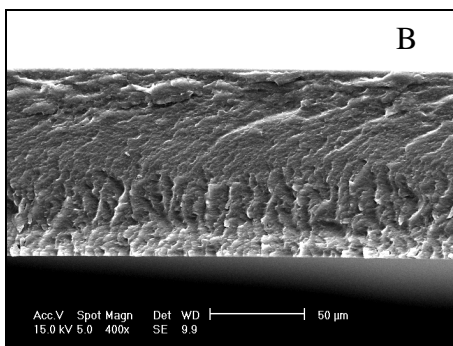
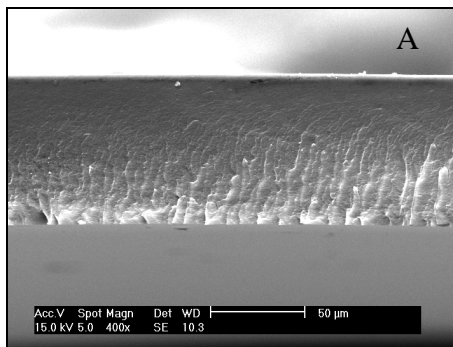


Figura 16: Micrografias da fratura transversal dos filmes de blendas QTS/PVA: A) 3:1, B) 3:2 e C) 1:1.

Do mesmo modo, os filmes de blendas QTS/PVA incorporados com CCS, Figura 17 (A-F), mostraram-se densos e rugosos. As micrografias das secções transversais mostram uma menor rugosidade para os filmes contendo um menor teor de CCS. Na Figura 17 (D), é possível observar algumas rachaduras na estrutura interna do filme enquanto nas demais se observa apenas certa rugosidade com presença de pequenos poros e aparentemente sem rachaduras.

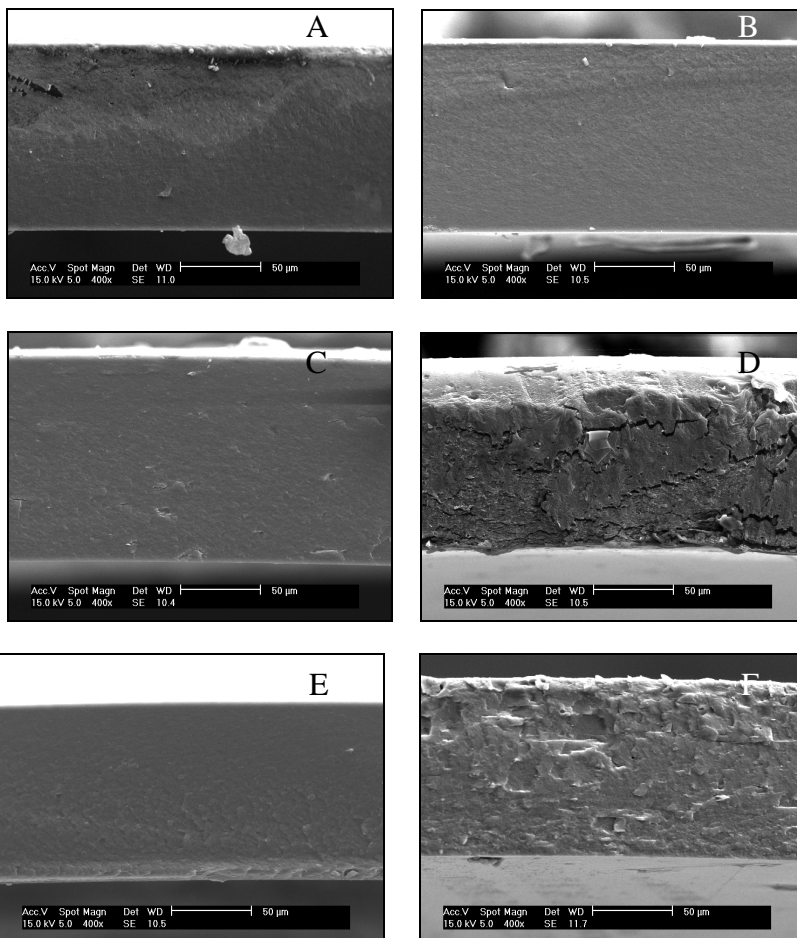


Figura 17: Micrografias da fratura transversal dos filmes de blendas de QTS/PVA incorporados com CCS: A) QTS/PVA 3:1 - CCS(1), B) QTS/PVA 3:1 - CCS(2), C) QTS/PVA 3:2 - CCS(1), D) QTS/PVA 3:2 - CCS(2), E) QTS/PVA 1:1 - CCS(1) e F) QTS/PVA 1:1 - CCS(2).

A Figura 18 (A e B) mostra as micrografias para os filmes de blendas de QTS/PVA contendo CCS e ZnO obtidas via MEV-EDX. É possível observar que estes filmes apresentaram-se rugosos e com algumas rachaduras, no entanto, sem a presença aparente de poros. Nota-se ainda a presença das pequenas partículas de ZnO uniformemente dispersas na matriz polimérica com tamanho inferior à 165nm. A análise de EDX, confirmou a presença das nanopartículas de ZnO no filme.

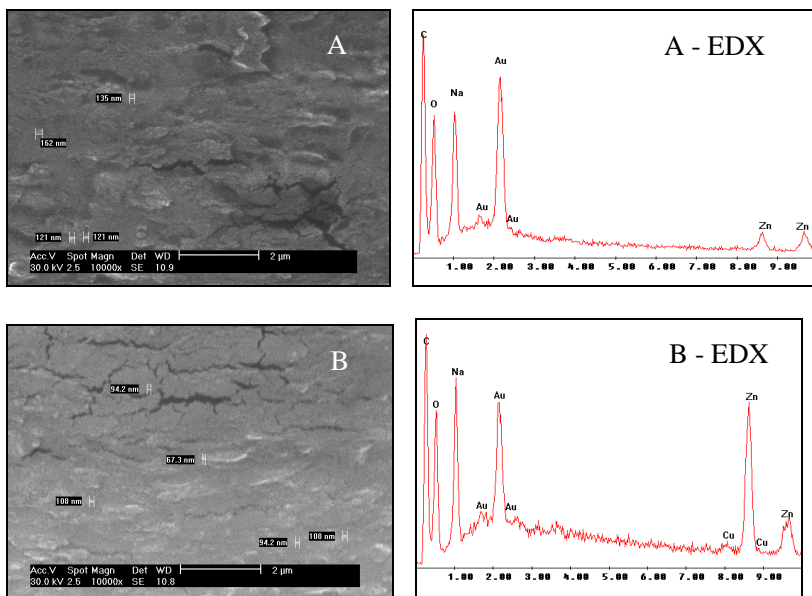


Figura 18: Micrografias da fratura transversal dos filmes de blendas de QTS/PVA incorporados com CCS e nanopartículas de ZnO, obtidas via MEV-EDX: A) QTS/PVA 1:1 - CCS(2) - ZnO(1) e B) QTS/PVA 1:1 - CCS(2) - ZnO(2).

5.2.5 Intumescimento dos Filmes

Observa-se pela Tabela 3, uma nítida diminuição no grau de intumescimento para os filmes de blendas de QTS/PVA à medida que o teor de PVA é aumentado. Os filmes de blendas com maior teor de QTS (QTS/PVA 3:1) quando adicionados de CCS mostraram uma diminuição no grau de intumescimento, correlacionado ao aumento de

CCS. Já os filmes de blendas QTS/PVA 3:2 e QTS/PVA 1:1 exibiram um aumento no grau de intumescimento com a adição de CCS. Os menores valores de intumescimento obtidos neste estudo foram para os filmes de blendas QTS/PVA 1:1 incorporados com CCS e nanopartículas de ZnO. Na presença de uma maior quantidade de QTS, a possível interação entre os grupos NH_3^+ da QTS e COO^- da CCS aumenta o caráter hidrofóbico da matriz polimérica diminuindo o grau de intumescimento. Ao contrário, quando há uma maior quantidade de PVA uma possível interação entre a CCS e o PVA deve diminuir as ligações de hidrogênio entre eles favorecendo o processo de solvatação da matriz polimérica. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos pelo estudo de espectroscopia no infravermelho.

Tabela 3: Intumescimento para os diferentes filmes de blendas obtidos neste estudo.

Amostra	Intumescimento ^a pH 7,0
QTS/PVA 3:1	185 ± 10
QTS/PVA 3:1 - CCS(1)	148 ± 7
QTS/PVA 3:1 - CCS(2)	140 ± 9
QTS/PVA 3:2	126 ± 4
QTS/PVA 3:2 - CCS(1)	152 ± 3
QTS/PVA 3:2 - CCS(2)	129 ± 2
QTS/PVA 1:1	80 ± 4
QTS/PVA 1:1 - CCS(1)	126 ± 11
QTS/PVA 1:1 - CCS(2)	136 ± 7
QTS/PVA 1:1 - CCS (2) - ZnO (1)	73 ± 3
QTS/PVA 1:1 - CCS (2) - ZnO (2)	87 ± 4

^a determinado pela média de 3 medidas, n=3.

5.2.6 Determinação das Propriedades Mecânicas para os Filmes de Blendas.

As propriedades mecânicas dos filmes desenvolvidos neste trabalho foram obtidas através das medidas de tensão na ruptura (TS), alongação máxima (%E) e módulo de elasticidade (ME) e são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Propriedades mecânicas dos diferentes filmes de blendas.

Amostra	Espessura (mm) ^a	Propriedades Mecânicas ^b		
		Tensão na Ruptura(MPa)	Deformação na Ruptura(%)	Modulo Elastic.(MPa)
QTS/PVA 3:1	0,079±0,010	5,18±0,34	54,07±7,72	152,49±11,21
QTS/PVA 3:1 - CCS(1)	0,076±0,012	5,21±0,35	60,48±1,93	157,93±10,03
QTS/PVA 3:1 - CCS(2)	0,073±0,009	6,51±0,94	56,38±3,89	188,36±25,56
QTS/PVA 3:2	0,075±0,010	4,81±1,16	59,90±9,42	166,68±18,25
QTS/PVA 3:2 - CCS(1)	0,077±0,015	4,78±0,44	84,52±1,93	112,64±11,37
QTS/PVA 3:2 - CCS(2)	0,078±0,006	6,25±1,33	73,36±6,76	160,41±28,65
QTS/PVA 1:1	0,083±0,013	4,32±1,00	78,36±10,86	114,67±13,24
QTS/PVA 1:1 - CCS(1)	0,108±0,011	5,01±0,82	127,55±14,34	82,68±10,76
QTS/PVA 1:1 - CCS(2)	0,076±0,018	4,88±0,92	110,29±4,71	93,40±15,79
QTS/PVA 1:1 - CCS(2)-ZnO(1)	0,078±0,023	4,59±1,54	43,95±15,27	162,57±40,85
QTS/PVA 1:1 - CCS(2)-ZnO(2)	0,075±0,016	5,57±2,00	51,77±16,93	193,57±53,33

^a determinado por medidas em 8 diferentes pontos ao longo dos filmes, n=8.

^b determinado pela média das medidas realizadas em 8 corpos de prova.

Através da análise da Tabela 4, verifica-se que a espessura média dos filmes foi de aproximadamente $0,079 \pm 0,009$ mm, não apresentado variações significativas na espessura com a mudança na composição.

Observa-se que quanto maior é o teor de quitosana nos filmes maior também é a sua tensão na ruptura, Tabela 4, fato também observado por Costa Jr. (2008), em estudos com blendas de QTS/PVA. É notório ainda, uma diminuição na deformação de ruptura e um aumento no módulo de elasticidade dos filmes com maior teor de quitosana, indicando uma maior fragilidade dos mesmos.

O aumento do teor de PVA nos filmes de blendas QTS/PVA provoca uma nítida mudança nas suas propriedades. A deformação na ruptura é aumentada e o módulo de elasticidade diminuído, quando comparados com os filmes de blendas com baixo teor de PVA, este comportamento pode estar associado ao poder plastificante que o PVA exerce sobre a quitosana, o qual diminui as interações intra e

intermoleculares entre as cadeias poliméricas, aumentando assim o espaço livre e a mobilidade das cadeias.

Quando comparados aos filmes de blendas compostos apenas de QTS/PVA os filmes de blendas QTS/PVA incorporados com CCS apresentaram um comportamento diferenciado. Observa-se na Tabela 4 que os filmes de QTS/PVA 3:1 quando adicionados de CCS sofrem um aumento na tensão de ruptura, na deformação e no módulo de elasticidade, mostrando-se um filme mais rígido. Já os filmes de QTS/PVA 3:2 e QTS/PVA 1:1 mostram um aumento na tensão de ruptura e na deformação e uma diminuição no módulo de elasticidade quando acrescidos de CCS. É claramente observado, ainda, que os filmes de QTS/PVA 3:2 e QTS/PVA 1:1 com 2,5% de CCS foram os que apresentaram maiores deformações na ruptura e menores módulos de elasticidade, sendo, portanto, os mais maleáveis. Isto indica uma influência bastante significativa do teor de quitosana e clorofilina nas propriedades mecânicas das amostras. Acredita-se que a clorofilina cúprica de sódio possa estar atuando como um agente reticulante para a cadeia polimérica da quitosana, onde ocorre uma interação eletrostática entre os grupos NH_3^+ e os grupos COO^- (reticulação iônica), tornando mais rígido os filmes com maior teor de QTS e CCS. A maleabilidade dos filmes, portanto, cresce à medida que aumenta-se o teor de PVA e diminui-se o teor de CCS nos filmes.

Foram avaliadas ainda, as propriedades mecânicas dos filmes de blendas de QTS/PVA 1:1 adicionadas de 5% de CCS e nanopartículas de ZnO (5% e 7,5%). A Tabela 4 mostra, que a introdução do material inorgânico (ZnO) na blenda polimérica de QTS/PVA 1:1 - CCS(2) compromete bastante a sua maleabilidade. Há uma acentuada diminuição da deformação na ruptura e um acentuado aumento no módulo de elasticidade conferindo uma maior rigidez para estes filmes. O aumento na rigidez deve estar associado à interações eletrostáticas entre os polímeros e o ZnO, restringindo a mobilidade das cadeias poliméricas. Comportamentos similares foram observados por Cui e colaboradores (2009) para membranas compósitas de QTS.

5.2.7 Avaliação da Atividade Antibacteriana dos Filmes de Blendas

Foi avaliado o poder bactericida dos filmes de blendas QTS/PVA 1:1, QTS/PVA 1:1 incorporados com 5% de CCS e QTS/PVA 1:1 incorporados com 5% de CCS e 7,5% nanopartículas de ZnO. O teste tem por objetivo estudar a eficiência na atividade antibacteriana dos filmes de blendas enriquecidos com CCS e nanopartículas de ZnO em comparação com os filmes de blendas composta apenas pelos polímeros, e os dados obtidos são apresentados na Tabela 5. De um modo geral, observa-se uma maior redução de bactérias gram-negativas (*E. coli*) quando colocadas sobre os filmes. Os filmes de blendas QTS/PVA 1:1 incorporados com 5% de CCS e 7,5% de ZnO foram os que mostraram-se mais eficientes, apresentando uma redução quase total no número de microorganismos viáveis (98,45% para as bactérias *S. aureus* e 98,99% para as bactérias *E.coli*), mostrando-se ainda mais efetiva no combate a bactérias gram-negativas.

Tabela 5: Atividade antibacteriana de diferentes filmes de blendas de QTS/PVA contra duas estirpes bacterianas.

Tempo de Exposição	Filmes testados					
	Controle (QTS/PVA 1:1)		QTS/PVA 1:1 - CCS(2)		QTS/PVA 1:1 - CCS(2) - ZnO(2)	
	<i>S. aureus</i> *	<i>E. coli</i> *	<i>S. aureus</i> *	<i>E. coli</i> *	<i>S. aureus</i> *	<i>E. coli</i> *
t ₀	215	176	213	185	258	198
t ₁	180	90	120	91	240	95
t ₂₄	56	19	24	2	4	2

* Valores expressos em UFC e representam a média de duas repetições.

Tabela 6: Porcentagem de redução de microorganismos para os filmes de blendas.

Tempo de Exposição	Redução de microorganismos para os filmes (%)					
	Controle (QTS/PVA 1:1)		QTS/PVA 1:1 - CCS(2)		QTS/PVA 1:1 - CCS(2) - ZnO(2)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
T ₂₄	73,96	89,21	88,74	98,92	98,45	98,99

6. Considerações Finais

- ✓ De acordo com os objetivos propostos e a partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a metodologia alternativa utilizada para o desenvolvimento dos filmes de blendas QTS/PVA incorporados com CCS mostrou-se viável e eficiente;
- ✓ O processo de síntese utilizado para a preparação de nanopartículas de ZnO, para a posterior incorporação em filmes de blendas QTS/PVA contendo o corante CCS foi eficiente, apresentando partículas esféricas, com tamanhos de distribuição uniforme em escala nanométrica, compreendendo uma faixa de tamanho de 50nm-150nm;
- ✓ A análise de DSC sugere a imiscibilidade dos dois polímeros na blenda formada, uma vez que apresenta duas temperaturas de transição vítrea. A análise indica ainda, que quando adicionados de nanopartículas de ZnO, os filmes incorporados com o corante CCS apresentam características ligeiramente rígidas, mostrando um aumento na Tg1 da blenda polimérica;
- ✓ As análises de IV sugerem possíveis interações entre a CCS e os dois polímeros constituintes da blenda (QTS e PVA) confirmada pela análise de DSC, onde ocorrem deslocamentos nas temperaturas de transição vítrea (Tg1 e Tg2);
- ✓ As análises de TG mostraram uma maior estabilidade térmica para os filmes de blendas de QTS/PVA na proporção 1:1 e incorporados com 5% de CCS. Estes filmes apresentaram significativa redução na estabilidade térmica quando foram acrescidos nanopartículas de ZnO;
- ✓ As micrografias dos filmes revelam uma baixa miscibilidade dos polímeros, corroborando os resultados obtidos por DSC. As fraturas transversais mostram que os filmes apresentam estrutura interna densa e rugosa, sendo que a rugosidade é aumentada com o aumento de CCS na matriz polimérica;
- ✓ A incorporação de CCS nos filmes de blendas provocou algumas modificações nas suas propriedades mecânicas. Os filmes com maior teor de QTS e CCS apresentaram-se mais

rígidos. Uma maior maleabilidade é alcançada quando o teor de PVA na blenda é aumentado e o teor de CCS diminuído. A adição de nanopartículas de ZnO nos filmes de blendas QTS/PVA 1:1 incorporados com CCS, restringiu a mobilidade das cadeias poliméricas, comprometendo bastante a maleabilidade dos filmes. Esta variedade de propriedades mecânicas viabiliza a utilização destes filmes em diversas aplicações;

- ✓ O teste de atividade antibacteriana comprovou a eficiência na redução de bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo que os filmes de blendas QTS/PVA 1:1 incorporados com 5% de CCS e 7,5% de nanopartículas de ZnO foram os que provocaram uma maior redução no número de bactérias, mostrando-se, ainda mais eficientes no combate a bactérias gram-negativas.

7. Perspectivas do Trabalho

Como perspectivas para a continuação deste trabalho, ficam a realização de outras técnicas que possam melhor verificar as interações entre o corante CCS e PVA. Sugere-se desenvolver filmes combinando o corante CCS com o polímero PVA totalmente hidrolisado e filmes com o corante CCS e o polímero PVA com um grau de hidrólise inferior ao utilizado neste estudo de modo a melhor verificar as interações entre os mesmos. A realização de um estudo de Difração de Raio X (DRX) para as nanopartículas de ZnO e dos filmes formados, não realizado neste estudo por falta de tempo. Estudos de teste em vivo, para a utilização dos filmes no processo de cicatrização de feridas.

8. Referências Bibliográficas

ARANHA, I. B.; LUCAS, R. F. Poli(Álcool Vinílico) Modificado com Cadeias Hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo. Polímeros: Ciência e Tecnologia, 11, N 4, 174-181, 2001.

ASTM D882/97, AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, ASTM International, 1997.

BRASIL. ANVISA. Decreto no 55.871/65 de 26 de março de 1965. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/decretos/55871_65.htm. Acesso em 14/01/2010.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. Química Nova, 30, N. 3, 644-650, 2007.

CASARIEGO, A.; SOUZA, B. W. S.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; CRUZ, L.; DÍAZ, R.; VICENTE, A. A. Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. Food Hydrocolloids, 23, 1895–1902, 2009.

CHIOU, M. S.; CHUANG, G. S. Competitive adsorption of dye metanil yellow and RB15 in acid solutions on chemically cross-linked chitosan beads. Chemosphere, 62, 731–740, 2006.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios, B.CEPPA, Curitiba, 20, N. 2, 203-220, 2002.

COSTA, A. C. F. M.; RAMALHO, M. A. F.; NEIVA, L. S.; ALVES-JR, S.; KIMINAMI, R. H. G. A.; GAMA, L. Avaliação do tamanho da partícula do ZnO obtido pelo método Pechini. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, 2.3, 14-19, 2007.

COSTA, A. C. F. M.; VILAR, M. A.; LIRA, H. L.; KIMINAMI, R. H. G. A.; GAMA, L. Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO₂. Cerâmica, 52, 255-259, 2006.

COSTA-JÚNIOR, E. S.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; MANSUR A. A. P.; VASCONCELOS, W. L.; MANSUR, H. S. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 76, 472-481, 2009.

COSTA-JÚNIOR, E. S.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Química Nova*, 31, N. 6, 1460-1466, 2008.

CUI, Z.; XING, W.; LIU, C.; LIAO, J.;ZHANG, H. Chitosan/heteropolyacid composite membranes for direct methanol fuel cell. *Journal of Power Sources*, 188, 24-29, 2009.

DEMERLIS, C. C.; SCHONEKER, D. R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology*, 41, 319–326, 2003.

DUNG, P. L.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; DESBRIÈRES, J.; Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 24, 209 - 214, 1994.

FARAG, A. A. M. Optical absorption of sodium copper chlorophyllin thin films in UV–vis–NIR region. *Spectrochimica Acta Part A*, 65, 667–672, 2006.

FEKETÉ, E.; FÖLDES, E.; PUKÁNSZKY, B. Effect of molecular interactions on the miscibility and structure of polymer blends. *European Polymer Journal*, 41, 727–736, 2005.

FERRUZZI, M. G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*, 27, 1– 12, 2007.

FERRUZZI, M. G.; FAILLA, M. L.; SCHWARTZ, S. J. Sodium Copper Chlorophyllin: In Vitro Digestive Stability and Accumulation by Caco-2 Human Intestinal Cells. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2173-2179, 2002.

GIOVINE, L. D.; FABIETTI, F. Copper chlorophyll in olive oils: identification and determination by LIF capillary electrophoresis. *Food Control*, 16, 267-272, 2005.

HE, Y.; ZHU, B.; INOUE, Y. Hydrogen bonds in polymer blends. *Prog. Polym. Sci.*, 29, 1021–1051, 2004.

HOUSE, P. G.; SCHNITZER, C. S. SERRS and visible extinction spectroscopy of copper chlorophyllin on silver colloids as a function of pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, 318, 145–151, 2008.

JUSTI, K. C.; LARANJEIRA, M. C. M.; NEVES, A.; MANGRICH, A. S.; FÁVERE, V.T. Chitosan functionalized with 2[-bis-(pyridylmethyl) aminomethyl]4-methyl-6-formyl-phenol: equilibrium and kinetics of copper (II) adsorption. *Polymer*, 45, 6285-6290, 2004.

KAPADIA, G. J.; BALASUBRAMANIAN, V.; TOKUDA, H.; IWASHIMA, A.; NISHINO, H. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate induced Epstein-Barr virus early antigen activation by natural colorants. *Cancer Letters*, 115, 173-178, 1997.

KAPADIA, G. J.; TOKUDA, H.; SRIDHAR, R.; BALASUBRAMANIAN, V.; TAKAYASU, J.; BU, P.; ENJO, F.; TAKASAKI, M.; KONOSHIMA, T.; NISHINO, H. Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic preparations. *Cancer Letters*, 129, 87–95, 1998.

KASEMETS, K.; IVASK, A.; DUBOURGUIER, H. C.; KAHRU, A. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro*, 23, 1116–1122, 2009.

KIM, J. K.; JO, C.; HWANG, H. J.; PARK, H. J.; KIM, Y. J.; BYUN, M. W. Color improvement by irradiation of Curcuma aromatica extract for industrial application. *Radiation Physics and Chemistry*, 75, 449–452, 2006.

KIMURA, I. Y.; GONÇALVES JR., A. C.; STOLBERG, J.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V.T. Efeito do pH e do Tempo de

Contato na Adsorção de Corantes Reativos por Microesferas de Quitosana. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Jul/Set, 51-57, 1999.

KITTUR, F. S.; THARANATHAN, R. N. Chitin – The Undisputed Biomolecule of Great Potential. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 43, 61-87, 2003.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin and chitosan – based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, 126 - 139, 2004.

LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 39, N.3, 2003.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico, *Química Nova*, 32, 672-678, 2009.

LEWANDOWSKA, K. Miscibility and thermal stability of poly(vinyl alcohol)/chitosan mixtures. *Thermochimica Acta*, 493, 42-48, 2009.

LÓPEZ-CARBALLO, G.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R.; OCIO, M. J. Photoactivated chlorophyllin-based gelatin films and coatings to prevent microbial contamination of food products. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 65–70, 2008.

MAPARI, S. A.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 231–238, 2005.

MARIA, T. M. C.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A.; HABITANTE, A. M. B. Q.; SOLORZA-FERIA, J. The effect of the degree of hydrolysis of the PVA and the plasticizer concentration on the color, opacity, and thermal and mechanical properties of films based on PVA and gelatin blends. *Journal of Food Engineering*, 87, 191–199, 2008.

MARTINELLI, A.; MATIC, A.; JACOBSSON, P.; BÖRJESSON, L.; NAVARRA, M. A.; FERNICOLA, A.; PANERO, S.; SCROSATI, B.

Structural analysis of PVA-based proton conducting membranes. *Solid State Ionics*, 177, 2431-2435, 2006.

MBHELE, Z. H.; SALEMANE, M. G.; VAN SITTEERT, C. G. C. E.; NEDELJKOVIC', J. M.; DJOKOVIC', V.; LUYT, A. S. Fabrication and Characterization of Silver-Polyvinyl Alcohol Nanocomposites. *Chem. Mater.*, 15, 5019-5024, 2003.

MORTENSEN, A.; GEPPPEL, A. HPLC-MS analysis of the green food colorant sodium copper chlorophyllin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 419-425, 2007.

MOTTERLINI, R.; FORESTI, R.; BASSI, R.; GREEN C. J. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 28, N. 8, 1303-1312, 2000.

MUCHA, M.; PAWLAK, A. Thermal analysis of chitosan and its blends. *Thermochimica Acta*, 427, 69-76, 2005.

OKUYAMA, K.; NOGUCHI, K.; KANENARI, M.; EGAWA, T.; OSAWA, K.; OGAWA, K. Structural diversity of chitosan and its complexes. *Carbohydrate Polymers*, 41, 237-247, 2000.

QIN, C.; LI, H.; XIAO, Q.; LIU, Y.; ZHU, J.; DU, Y. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 63, 367-374, 2006.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, 31, 603-632, 2006.

SHANG, Y. J.; JIN, X. L.; SHANG, X. L.; TANG, J. J.; LIU, G. Y.; DAI, F.; QIAN, Y. P.; FAN, G. J.; LIU, Q.; ZHOU, B. Antioxidant capacity of curcumin-directed analogues: Structure-activity relationship and influence of microenvironment. *Food Chemistry*, 119, 1435-1442, 2010.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer*, 41, 1955-1968, 2005.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects - an update. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 1047 – 1067, 2001.

SOARES, R. R. S. Estudo de propriedades da clorofila a e da feofitina a visando a terapia fotodinâmica. Dissertação de Mestrado, p.11, Universidade Estadual de Maringá, 2006.

SREEDHAR, B.; SAIRAM, M.; CHATTOPADHYAY, D. K.; SYAMALA RATHNAM, P. A.; MOHAN RAO, D. V. Thermal, Mechanical, and Surface Characterization of Starch–Poly(vinyl alcohol) Blends and Borax-Crosslinked Films. **Journal of Applied Polymer Science**, 96, 1313-1322, 2005.

SRINIVASA, P. C.; RAMESH, M. N.; KUMAR, K. R. THARANATHAN, R. N. Properties and sorption studies of chitosan–polyvinyl alcohol blend films. *Carbohydrate Polymers*, 53, 431-438, 2003.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. *Ciência Rural*, 35, N. 3, 748-755, 2005.

TAM, K. H.; DJURIŠIĆ, A. B.; CHAN, C. M. N.; XI, Y. Y.; TSE, C. W.; LEUNG, Y. H.; CHAN, W. K., LEUNG, F. C. C.; AU, D. W. T. Antibacterial activity of ZnO nanorods prepared by a hydrothermal method. *Thin Solid Films*, 516, 6167-6174, 2008.

TAN, C. S.; KHOR, E.; TAN, T. K.; WONG, S. M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivate UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, 45, 713 – 719, 1998.

TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G. K.; DUTTA, P. K. Physicochemical and bioactivity of cross-linked chitosan–PVA film for food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 372-376, 2009.

UZUN, I. Kinetics of the adsorption of reactive dyes by chitosan. *Dyes and Pigments*, 70, 76-83, 2006.

VICENTINI, D. S.; SMANIA JÚNIOR, A.; LARANJEIRA, M. C. M. Chitosan/poly (vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers. *Materials Science and Engineering C*, 2009. Doi: 10.1016/j.msec.2009.01.026.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. *Alim. Nutr.*, Araraquara, 20, N.1, 157-166, 2009.

YANG, D.; LI, J.; JIANG, Z.; LU, L.; CHEN, X. Chitosan/TiO₂ nanocomposite per vaporation membranes for ethanol dehydration. *Chemical Engineering Science*, 64, 3130 – 3137, 2009.

YANG, J. M.; YU SU, W.; LEU, T. L.; YANG, M. C. Evaluation of chitosan/PVA blended hydrogel membranes. *Journal of Membrane Science*, 236, 39-51, 2004.

ZHANG, G.; XU, W.; LI, Z.; HU, W.; WANG, Y. Preparation and characterization of multi-functional CoFe₂O₄–ZnO nanocomposites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 1424–1427, 2009.

ZHANG, L.; DING, Y.; POVEY, M.; YORK, D. ZnO nanofluids – A potential antibacterial agent. *Progress in Natural Science*, 18, 939–944, 2008.

ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. *Polymer Testing*, 23, 575-579, 2004.